Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. W. Hort

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN SOGENANNTEN HYPERPLASTISCHEN KNOTEN DER RATTENLEBER WÄHREND DER AFLATOXIN-INDUZIERTEN CARCINOGENESE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
CORDULA SCHMOLKE

1982

UNIV.
LONDON
MED.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0025

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. W. Hort

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN SOGENANNTEN HYPERPLASTISCHEN KNOTEN DER RATTENLEBER WÄHREND DER AFLATOXIN–INDUZIERTEN CARCINOGENESE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
CORDULA SCHMOLKE

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr.med.G.Arnold

Referent
gez.: Dr.med.(Pisa)habil.A.M.Novi

Korreferent
gez.: Prof.Dr.med.W.Wechsler

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung 1

II. Material und Methode 5
1. Tierversuche 5
1.1 Versuchstiere 5
1.2 Carcinogenbehandlung 5
2. Elektronenmikroskopische Technik 7
3. Lichtmikroskopische Technik 8

III. Ergebnisse 10
1. Befunde an Kontrolltieren 10
2. Befunde an Aflatoxin B_1-behandelten Ratten 10
2.1 Frühe Knoten 11
2.1.1 Makroskopie 11
2.1.2 Lichtmikroskopie 11
2.1.3 Elektronenmikroskopie 14
2.2 Mittlere Knoten 43
2.2.1 Makroskopie 43
2.2.2 Lichtmikroskopie 43
2.2.3 Elektronenmikroskopie 46
2.3 Späte Knoten 60
2.3.1 Makroskopie 60
2.3.2 Lichtmikroskopie 60
2.3.3 Elektronenmikroskopie 62

IV. Diskussion 78

V. Zusammenfassung 91

VI. Literaturverzeichnis 95

I. EINLEITUNG

Nach der heute allgemein vertretenen Hypothese geht die Entwicklung des Lebercarcinoms in mehreren Schritten vor sich (FARBER et al.,1975,FARBER,1976 a,1976 b,FARBER et al., 1976,PITOT,1977,EMMELOT und SCHERER,1980),wobei neue Zellpopulationen auftreten,welche Zwischenstufen der zellulären Umwandlung von normalen Hepatocyten über präneoplastische Leberzellen bis hin zum hochmalignen Lebercarcinom darstellen.Als morphologisches Korrelat dieses Geschehens werden verschiedene,nacheinander erscheinende,herdförmige Leberveränderungen beschrieben (FARBER,1976 b,FARBER et al.,1976, NEWBERNE,1976).Die sogenannten hyperplastischen Knoten werden dabei als die bedeutenste Zwischenstufe bei der malignen Transformation angesehen (FARBER,1973). Entsprechend der in der Literatur zur Zeit gültigen Definition (BANNASCH,1976) werden unter dem Begriff "hyperplastische Knoten" umschriebene,runde Parenchymbezirke der Leber von makroskopischer Größenordnung zusammengefaßt,welche mehr oder weniger stark über die Leberoberfläche erhaben sind.Als "hyperplastisch" werden solche Strukturen bezeichnet,weil sie lichtmikroskopisch herdförmige Anhäufungen von Hepatocyten darstellen,welche in der Regel sogar eine Kompression des angrenzenden Leberparenchyms verursachen. Die typische Architektur normalen Lebergewebes ist innerhalb hyperplastischer Knoten größtenteils aufgehoben. Hyperplastische Knoten sind in den verschiedensten Modellen der experimentellen Lebercarcinogenese beobachtet worden (FARBER,1955,POPPER et al.,1960,REUBER,1965,EPSTEIN et al., 1967,NEWBERNE und WOGAN,1968,TEEBOR und SEIDMANN,1970, BANNASCH,1974,KALENGAY und DESMET,1975,WARD et al.,1975, RUEBNER et al.,1976,SOLT et al.,1977).Die Darstellungen der Beobachtungen sind dabei jedoch sehr widersprüchlich. Die Angaben über die Größe der Knoten schwanken zwischen 2 und 35 mm,und die Farbskala reicht von weißlich über grau und gelblich bis zu bräunlich oder rot-braun,der normalen

UNIV. LEIDEN BIBL.

Farbe der Leber.Histologisch werden hyperplastische Knoten als Anhäufungen von Leberzellen beschrieben,die bezogen auf die Zellgröße sowie die Anfärbbarkeit des Cytoplasmas der einzelnen Hepatocyten mit sauren und basischen Farbstoffen entweder das Bild einer homogenen oder aber das einer heterogenen Zellpopulation hervorrufen.Im Vergleich zu der großen Anzahl lichtmikroskopischer Untersuchungen an hyperplastischen Knoten sind bisher nur wenige ultramikroskopische Studien (Tab.1) durchgeführt worden.Da aufgrund der allgemeinen Auffassung die hyperplastischen Knoten aus einer Population von Hepatocyten mit neuartigen Eigenschaften (präneoplastische Zellen) bestehen (FARBER,1973,NEWBERNE, 1976),scheinen elektronenmikroskopische Untersuchungen aber besonders geeignet,um über ein genaues Studium der morphologischen Merkmale dieser Strukturen zu einem besseren Verständnis der Entwicklung des Leberkrebs beizutragen.Mit diesem Ziel wurde die vorliegende Untersuchung durchgeführt.

Hierfür wurde das Aflatoxin-Modell gewählt,da das Aflatoxin B_1 sich im Experiment als eines der wirksamsten Carcinogene erwiesen hat (MAUGH II,1978) und so gering dosiert werden kann,daß selbst unter Vermeidung toxischer Nebenwirkungen eine Leberkrebsinzidenz von 100 % erzielt wird (WOGAN,1973,NOVI,1977).
Aflatoxine sind Metaboliten der Schimmelpilzarten Aspergillus flavus und Aspergillus parasiticus,welche bevorzugt auf in feucht-warmer Umgebung gelagerten Erdnüssen und Getreidearten wie zum Beispiel Mais gedeihen (LANCASTER et al., 1961,WOGAN,1966,1973).Sie gehören zu den Mykotoxinen und rufen bei zahlreichen Tierarten ausgeprägte toxische Leberveränderungen hervor (NEWBERNE und BUTLER,1969).Das Potenteste unter diesen Toxinen ist das Aflatoxin B_1 (WOGAN,1966).
Es erzeugt hepatocelluläre Carcinome bei Ratten,Mäusen, Frettchen,Spitzhörnchen (Tupaia glis),Rhesus-Äffchen,Regenbogen-Truthähnen,Enten und Guppys (Lebister reticulatus) (CARNAGHAN,1965,NEWBERNE und WOGAN,1968,NEWBERNE und BUTLER,

Tabelle 1

LITERATURÜBERSICHT ÜBER DIE MORPHOLOGISCHEN MERKMALE ULTRAMIKROSKOPISCH UNTERSUCHTER HYPERPLASTISCHER KNOTEN IN DER RATTENLEBER

Jahr	Autor	Carcinogen	Morphologische Merkmale									
			Makroskopisch		Lichtmikroskopisch		Ultramikroskopisch					
							Veränderungen im Cytoplasma				Veränderungen im Zellkern	
			Größe (Durchmesser in mm)	Farbe	Läppchenarchitektur	Zellpopulation	Endoplasmatisches granulär	Retikulum agranulär	Ribosomen	Glykogen	Zellkern	Nukleolus
1967	MERKOW et al.	2-Fluorenyl-acetamid*	7 - 30	grau bis gelblich-braun	nicht erhalten	homogen (vergrößerte Eosinophile)	↓	↑	——	↑	——	——
1969	MERKOW et al.	2-Fluorenyl-acetamid*	7 - 30	hell bräunlich	nicht erhalten	homogen (vergrößerte Eosinophile)	n/↓	↑	↑	↑	——	——
1971	MERKOW et al.	Ethionin*	6 - 35	grau bis gelblich-braun	nicht erhalten	homogen (vergrößerte Eosinophile)	n/↓	↑	——	——	n	——
1973	BRUNI	Diethyl-nitrosamin**	——	——	——	——	↑/↓	↑	↑	↓	——	vergrößert
1974	HANNASCH et al.	Thio-acetamid**	——	——	nicht erhalten	heterogen (Glykogenspeicherzellen,	n	n	↑	↑	——	——
						Eosinophile,	——	↑	——	↑/↓	——	——
						Fettspeicherzellen,	——	——	——	——	——	——
						Basophile)	↑	↓	↑	↓	vergrößert	vergrößert

* intermittierendes Behandlungsschema;
** kontinuierliche Gabe;
n= normal, ↑ = vermehrt, ↓ = vermindert, n/↓ = normal oder vermindert, ↑/↓ = vermehrt oder vermindert,
—— = keine Angaben

1969,HALVER,1969,SATO et al.,1973,ADAMSON et al.,1976, REDDY et al.,1976).Außerdem belegen epidemiologische Daten aus verschiedenen Ländern der dritten Welt eine deutliche Korrelation zwischen dem Risiko für Menschen,an Leberkrebs zu erkranken,und dem Ausmaß der Kontamination der Nahrung mit Aflatoxinen (SHUNK et al.,1972,VAN RENSBURG et al.,1975, PEERS et al.,1976).

II. MATERIAL UND METHODE

1. Tierversuche

1.1 Versuchstiere

Weibliche Wistar II-Ratten vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover, Bundesrepublik Deutschland, wurden als 50 g schwere Jungtiere erworben und in einem vollklimatisierten Raum mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus zu je 5 Tieren in Kunststoffkäfigen gehalten. Sie erhielten Wasser (Leitungswasser) und Futter (Altromin Zuchtdiät 1310) ad libitum bis zum Zeitpunkt der Tötung. Als die Ratten ein Gewicht von 100 g erreicht hatten, wurden sie in Drahtkäfige umgesetzt, und die Carcinogenbehandlung wurde begonnen. Alle Tiere wurden regelmäßig gewogen. Während der Carcinogenbehandlung wurden die Ratten zu je 2 bis 4 Versuchstieren und 1 bis 2 Kontrolltieren in wöchentlichen Abständen getötet, nach dem Absetzen des Carcinogens in Abständen von 2 bis 4 Wochen. Die Tötung erfolgte in Äthernarkose. Um Variationen infolge des circadianen Rhythmus des Leberstoffwechsels (CHEDID und NAIR, 1972) zu vermeiden, wurden die Ratten immer zwischen 11 und 13 Uhr getötet. Alle Tiere wurden vollständig obduziert.

1.2 Carcinogenbehandlung

63 weibliche Wistar II-Ratten erhielten 8 Wochen lang an jeweils 5 Tagen in der Woche 25 µg Aflatoxin B_1 (Makor chemicals Inc., Jerusalem, Israel) gelöst in 2,5 µl Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, Bundesrepublik Deutschland) und mit destilliertem Wasser zu 1 ml Lösung gebracht durch die Magensonde. Das entspricht einer Gesamtdosis von 1 mg Aflatoxin B_1 in 100 µl Dimethylformamid (Tab. 2: Versuch I). In Übereinstimmung mit der Literatur ist diese Versuchsanordnung optimal für die Untersuchung der Carcinogenese, da

Tabelle 2

EXPERIMENTELLES PROGRAMM

Versuche	Anzahl der Tiere*	Substanz	Dosierung	Behandlungsdauer in Wochen	Applikationsart
I	63	AFB_1**	25µg, 5x pro Woche	8	Magenintubation
II	49	AFB_1**	50µg, 5x pro Woche	12(intermittierend)****	Magenintubation
Kontrollversuche:					
I	40	DMF***	2,5µg, 5x pro Woche	8	Magenintubation
II	25	DMF***	5,0µg, 5x pro Woche	12(intermittierend)****	Magenintubation

* Weibliche Wistar II-Ratten
** AFB_1 = Aflatoxin B_1
*** DMF = Dimethylformamid
**** genaues Dosierungsschema siehe Text (Material und Methode)

es in 100 % der Fälle zur Entwicklung von Lebertumoren kommt unter Vermeidung toxischer Begleiterscheinungen (WOGAN,1973,NOVI,1977).
Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt,daß das Dosierungsschema die Bildung hyperplastischer Knoten beeinflußt (REUBER,1965,EPSTEIN et al.,1967,TEEBOR und BECKER,1971). Deshalb wurde Versuch II (Tab.2) durchgeführt nach einem Behandlungsschema,das nach Angabe der Literatur in anderen Systemen der Carcinogenese einerseits häufiger zur Entwicklung von Knotenstrukturen und andererseits zur Bildung größerer hyperplastischer Knoten führt (EPSTEIN et al.,1967, MERKOW et al.,1969,1971).
49 Ratten erhielten insgesamt sowie in jeder Einzeldosis die doppelte Menge Aflatoxin B_1 durch die Magensonde - also 40 Einzelgaben von je 50 µg Aflatoxin B_1 gelöst in 5 µl Dimethylformamid mit destilliertem Wasser zu 1 ml Lösung gebracht.Die Gabe erfolgte nach einem diskontinuierlichen Schema von 3 Wochen Behandlung,2 Wochen Pause,2 Wochen Behandlung,2 Wochen Pause und abschließend 3 Wochen Behandlung.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht,wurden zwei Kontrollgruppen von 40 und 25 Ratten nur mit Dimethylformamid durch die Magensonde behandelt - in gleicher Dosierung und nach demgleichen Schema wie die Aflatoxin B_1-behandelten Tiere in Versuch I und II.

2. Elektronenmikroskopische Technik

Zur Fixierung des Lebergewebes diente eine Mischung aus gekühlter 2,5 %iger Glutaraldehydlösung,0,4 %iger Paraformaldehydlösung und 0,1 M Cacodylatpuffer mit einem pH von 7,4. Die Gesamtosmolalität der Lösung betrug 358 mosmol.
Solange der makroskopische Aspekt der Leber bis auf vereinzelte kleine,sogenannte frühe Knoten unauffällig war, erfolgte die Fixierung der Leber durch Perfusion nach der Methode von FAHIMI (1967).Zu späteren Zeitpunkten im Ver-

lauf der Carcinogenese,als vom makroskopischen Aspekt her eine gleichmäßige Perfusion der Leber nicht mehr gewährleistet erschien,erfolgte die Fixierung des Lebergewebes durch Immersion.Fixierungsartefakte bei dieser Technik, wie das Auftreten heller und dunkler Zellen (GANOTE und MOSES,1968) konnten aufgrund der schnellen Bearbeitung vermieden werden.Sofort nach der Vorfixierung durch Perfusion oder Immersion wurden Gewebestückchen von 0,5 mm Kantenlänge geschnitten und 2,5 Stunden in oben beschriebener Lösung weiterfixiert.
Übernacht wurden die Gewebeproben in einer Lösung von 0,2 M Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und am nächsten Tag 1 Sturde lang in 1 %iger OsO_4-Lösung in 0,1 M Sörensen-Phosphatpuffer bei pH 7,3 nachfixiert. Die Gewebeproben wurden anschließend in Paladepuffer gewaschen,in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Araldite eingebettet.

Knotenartiges Gewebe wurde getrennt von dem umgebenden Lebergewebe eingebettet.Von den Blöcken wurden Semidünnschnitte von etwa 1 µm Dicke angefertigt und mit Methylenblau gefärbt.Nach lichtmikroskopischer Identifizierung der Befunde wurden die ausgewählten Areale elektronenmikroskopisch untersucht.Dieses Vorgehen erlaubte,elektronenmikroskopisch die Äquivalente der lichtmikroskopischen Bilder genau wiederzuerkennen.
Alle Semi- und Ultradünnschnitte wurden an einem Reichert-Ultramikrotom angefertigt,wobei für die Ultradünnschnitte ein Diamantmesser verwendet wurde.Nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurden die Schnitte an einem Siemens 101-Elektronenmikroskop bei 60 kV mit doppeltem Kondensor untersucht.

3. Lichtmikroskopische Technik

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden Leber,Herz,Lunge, Niere und Milz systematisch histologisch untersucht.Bei makroskopisch erkennbaren Veränderungen wurden auch andere

Organe aufgearbeitet.
Das Gewebe wurde in 10 %iger gepufferter Formalinlösung fixiert,in Paraffin eingebettet geschnitten und routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin,PAS und nach van Gieson gefärbt.Die Leberschnitte wurden darüberhinaus ebenfalls routinemäßig mit Kresylviolett und Fettrot (Gefrierschnitte) gefärbt.

III. ERGEBNISSE

1. Befunde an Kontrolltieren

Bei den Ratten der beiden Kontrollgruppen (Tab.2) sind zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung morphologische Veränderungen der Leber zu beobachten.

2. Befunde an Aflatoxin B_1-behandelten Ratten

Die ersten makroskopisch erkennbaren hyperplastischen Knoten werden sowohl in Versuch I als auch in Versuch II (Tab.2) erst Monate nach Absetzen des Carcinogens beobachtet.In Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Aflatoxin B_1-induzierten Carcinogenese weisen diese Strukturen unterschiedliche makroskopische Merkmale auf und werden aus diesem Grunde in frühe,mittlere und späte Knoten eingeteilt.Da durch die veränderten experimentellen Bedingungen in Versuch II (Tab.2) im Vergleich zu Versuch I nur der Zeitraum bis zum ersten Auftreten hyperplastischer Knoten verkürzt wird,können die morphologischen Befunde aus beiden Versuchen gemeinsam beschrieben werden.

2.1 Frühe Knoten

Die ersten knotenförmigen Gebilde an der Leber,die aufgrund der zuvor erwähnten Einteilungskriterien als frühe Knoten bezeichnet werden,treten in Versuch I 51 Wochen und in Versuch II 33 Wochen nach Absetzen des Carcinogens auf.Bezogen auf den jeweiligen Versuchsbeginn (Tab.2) ergibt sich bis zum Erscheinen dieser Strukturen ein Zeitintervall von 59 Wochen in Versuch I und 45 Wochen in Versuch II.Die frühen Knoten sind nur für einen Zeitraum von etwa 5 Wochen auf der Oberfläche oder auf der Schnittfläche der Leber zu beobachten.

2.1.1 Makroskopie

Makroskopisch erscheinen die frühen Knoten als umschriebene,hellbraun-rötliche Bezirke von 1 bis 2 mm Durchmesser,die nur gering über die Leberoberfläche erhaben sind.

2.1.2 Lichtmikroskopie

In der Übersichtsvergrößerung heben sich die frühen Knoten deutlich als rundliche Bezirke mit nur angedeuteter Kompression von dem umgebenden Leberparenchym ab (Abb.1). Meist werden diese Strukturen von einer gemischten Population unterschiedlich großer Hepatocyten gebildet,wobei die typische Architektur der Leberläppchen größtenteils aufgehoben ist.Besonders die größeren Leberzellen sind häufig durch meist ausgedehnte Plasmavakuolen gekennzeichnet (große vakuolisierte Leberzellen: siehe Abb.2),oder aber sie enthalten mehr oder weniger umfangreiche homogene Cytoplasmabezirke (große Leberzellen mit homogenen Cytoplasmabezirken: siehe Abb.4,Einsatz).Dazwischen befinden sich vereinzelt Hepatocyten in Mitose,die gleichfalls eine deutliche Vakuolisierung ihrer Zellperipherie aufweisen.In Nachbarschaft zu den größeren Leberzellen befinden sich kleine bis mittelgroße Hepatocyten,welche

Abb.1 Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme eines frühen Knotens der Rattenleber 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Besonders auffallend die scharfe Abgrenzung des Knotens (K) gegenüber dem umgebenden Leberparenchym (L).
Färbung: Hämatoxylin-Eosin.(Vergr. 15 x)

Abb.2 Partie aus einem frühen Knoten der Rattenleber 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1 im lichtmikroskopischen Bild.Mischpopulation aus großen vakuolisierten Leberzellen (Bildmitte) und deutlich kleineren Hepatocyten in unmittelbarer Nachbarschaft.
Färbung: Hämatoxylin-Eosin.(Vergr. 150 x)

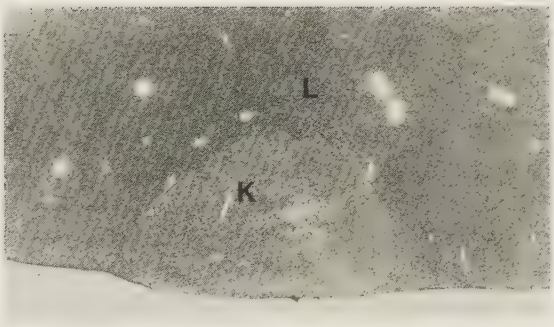

Abb. 1

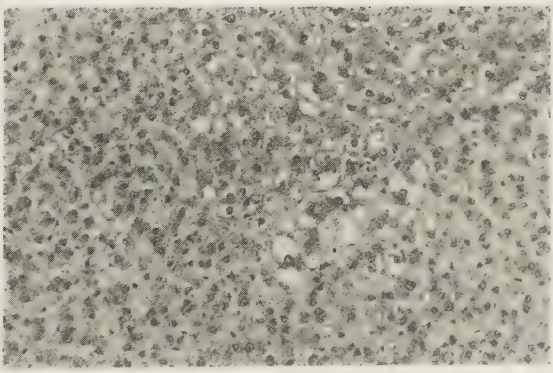

Abb. 2

überwiegend zu mehreren auf einem Zellbalken angeordnet sind.Auch diese lassen,wenngleich nicht so häufig wie ihre größeren Nachbarzellen,eine Vakuolenbildung erkennen.

2.1.3 Elektronenmikroskopie

Ultramikroskopisch ist die zelluläre Heterogenität der frühen Knoten noch ausgeprägter als im lichtmikroskopischen Bild.Es zeigt sich nämlich,daß lichtmikroskopisch gleichartig aussehende Zellen elektronenmikroskopisch eine ganz unterschiedliche Feinstruktur besitzen können.Dies läßt sich besonders mit Hilfe der von uns ausgewählten Methode beobachten,wobei die elektronenmikroskopisch zu untersuchenden Zellen zuvor auf Semidünnschnitten lichtmikroskopisch identifiziert werden.Da lichtmikroskopisch die Zellgröße das Hauptmerkmal für die Unterscheidung der Zellen darstellt,halten wir uns auch bei der Schilderung der ultramikroskopischen Befunde an dieses Einteilungskriterium.

Elektronenmikroskopisch kann den beiden lichtmikroskopisch bereits identifizierten Typen der großen Leberzellen jeweils ein bestimmtes Äquivalentbild eindeutig zugeordnet werden.

Die elektronenmikrsokopischen Äquivalente der großen vakuolisierten Leberzellen sind charakterisiert durch ausgedehnte,elektronenoptisch leere Cytoplasmabezirke,die nur noch spärliche Reste zerfallender,vesikulärer und tubulärer Strukturen erkennen lassen (Abb.3).An diese Bezirke angrenzendes Cytoplasma,welches dagegen kaum degenerative Veränderungen zeigt,besteht vorwiegend aus parallel angeordneten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums und reichlich dazwischengelagerten Mitochondrien und Mikrokörpern. Außer gut entwickelten Golgi-Feldern und Lysosomen finden sich frei im Cytoplasma gelegene Lipidtropfen ohne erkennbare Membranbegrenzung.Kennzeichnend ist weiterhin,daß diese Zellen weder agranuläres endoplasmatisches Retikulum noch

Glykogen zu enthalten scheinen.Die Zellkerne sind meist mit mäßig tiefen Einziehungen versehen und enthalten in verdichtetem Karyoplasma vergrößerte,netzförmig aufgebaute Nukleoli.Die Zellmembran sowie die Mikrovilli erscheinen unverändert,während die Interzellularspalten stellenweise erweitert sind und feingranuläres,mäßig elektronendichtes Material enthalten.
Nur selten sind die beschriebenen cytoplasmatischen Veränderungen so stark ausgeprägt,daß der Zellkern als einziges Organell in einem von der Zellmembran umschlossenen,elektronenoptisch leeren Zellinneren zu identifizieren ist.

Abb.3 Elektronenmikroskopisches Äquivalent einer großen vakuolisierten Leberzelle in einem frühen Knoten 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Ausgedehnte, annäherd strukturlose Cytoplasmabezirke (*) neben überwiegend aus granulärem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien bestehenden,gut erhaltenen Cytoplasmaanteilen.Gut ausgebildete Golgi-Felder (G). Ly= Lysosomen.L= Lipidtropfen.Große unregelmäßig begrenzte Zellkerne (N) mit prominenten Nukleoli (Nc). Erweiterter Interzellularspalt (IS).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 15 000 x)

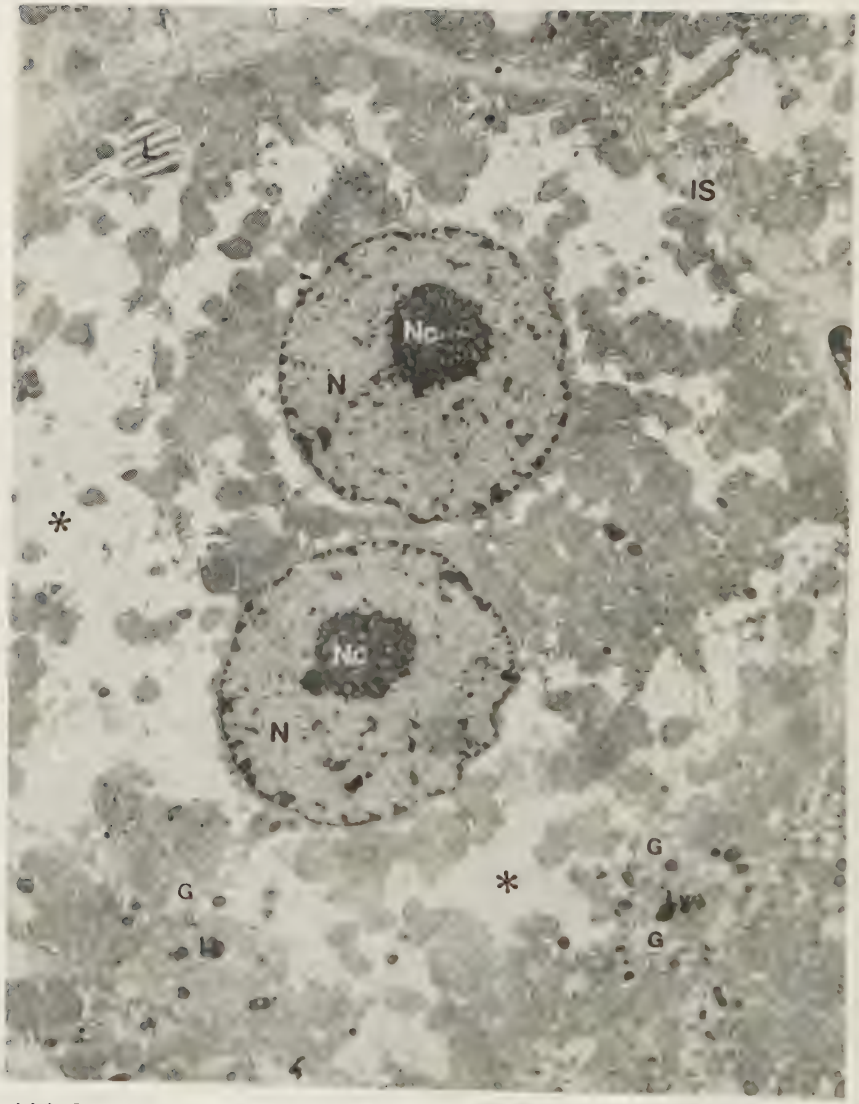

Abb. 3

Die elektronenmikroskopischen Äquivalente der großen Leberzellen mit homogenen Cytoplasmabezirken sind dadurch charakterisiert,daß weite Teile der Zellen von zerfallenden Vesikeln des agranulären endoplasmatischen Retikulums ausgefüllt sind,und dürfen somit als stark degenerierte Form von Leberzellen mit reichlich agranulärem endoplasmatischem Retikulum (degenerierende AR-reiche Leberzellen) angesehen werden (Abb.4).Inmitten der Ansammlungen von Elementen des agranulären endoplasmatischen Retikulums sind als Ausdruck einer vollständigen Auflösung der agranulären Membranen annähernd strukturlose Bezirke zu beobachten,welche manchmal nur von geringer,manchmal aber auch von größerer Ausdehnung sein können.Die übrigen Bestandteile des Cytoplasmas zeigen ebenfalls ausgeprägte degenerative Veränderungen. Die Mitochondrien sind in ihrer Anzahl stark vermindert und lassen kaum eine Innenstruktur in ihrer stark verdichteten Matrix erkennen.Dadurch können sie nicht eindeutig von degenerativ veränderten Lysosomen und Mikrokörpern unterschieden werden.Das granuläre endoplasmatische Retikulum ist nur spärlich vorhanden und erstreckt sich vorwiegend zwischen den Mitochondrien.Die granulären Zisternen,die meist eine Erweiterung ihres Lumens zeigen,lassen in der Regel keine Membranbegrenzung erkennen.Dadurch scheinen die Ribosomen,welche in unauffälliger Weise entlang der Zisternen angeordnet sind,das elektronenoptisch leere Lumen unmittelbar zu begrenzen (Abb.5).Freie Ribosomen finden sich in dem stark verdichteten Grundplasma zwischen dem granulären endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien.Golgi-Felder sind nur schwer abzugrenzen,und Glykogenpartikel lassen sich nicht identifizieren.
Der Zellkern ist meist von unregelmäßiger Gestalt,wobei die Membranen der Kernhülle kaum zu erkennen sind.In dem ebenfalls stark verdichteten Karyoplasma befindet sich ein meist auffallend großer Nukleolus von netzförmigem Aufbau,der eine deutlich vermehrte Osmiophilie seiner Strukturen aufweist.Außerdem ist ein fast vollständiger Verlust der

Zellmembran zu beobachten,so daß zwei benachbarte Zellen durch einen elektronenoptisch leeren Spalt voneinander getrennt scheinen.

Abb.4 Elektronenmikroskopisches Äquivalent einer großen Leberzelle mit homogenen Cytoplasmabezirken (degenerierende AR-reiche Leberzelle) in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Gegenüber den umfangreichen Ansammlungen zerfallender Vesikel des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR) übrige Cytoplasmabestandteile stark reduziert.In enger räumlicher Beziehung zu den Mitochondrien (M) mit stark verdichteter Matrix spärliche,erweiterte Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR).Zellkern (N) mit verdichtetem Karyoplasma.Stark osmiophiler Nukleolus (Nc).Vollständiger Verlust der Zellmembran (↓) (geprüft bei stärkerer Vergrößerung). Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 12 000 x)

Einsatz: Lichtmikroskopisches Bild einer großen Leberzelle mit homogenen Cytoplasmabezirken in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.
Semidünnschnitt.Färbung: Methylenblau.(Vergr. 1000 x)

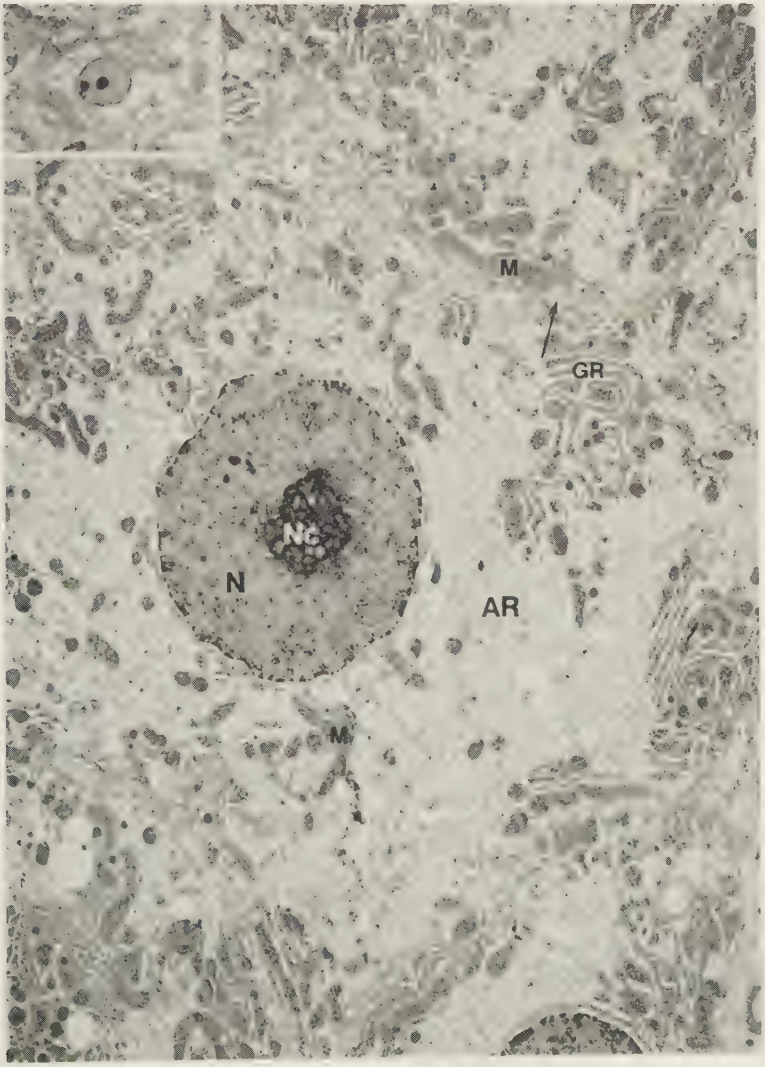

Abb. 4

Abb.5 Ausschnitt aus einer degenerierenden Leberzelle mit reichlich agranulärem endoplasmatischem Retikulum in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Bei stärkerer Vergrößerung ist die Degeneration sowohl des agranulären (AR) als auch des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR) deutlich zu erkennen. Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 24 000 x)

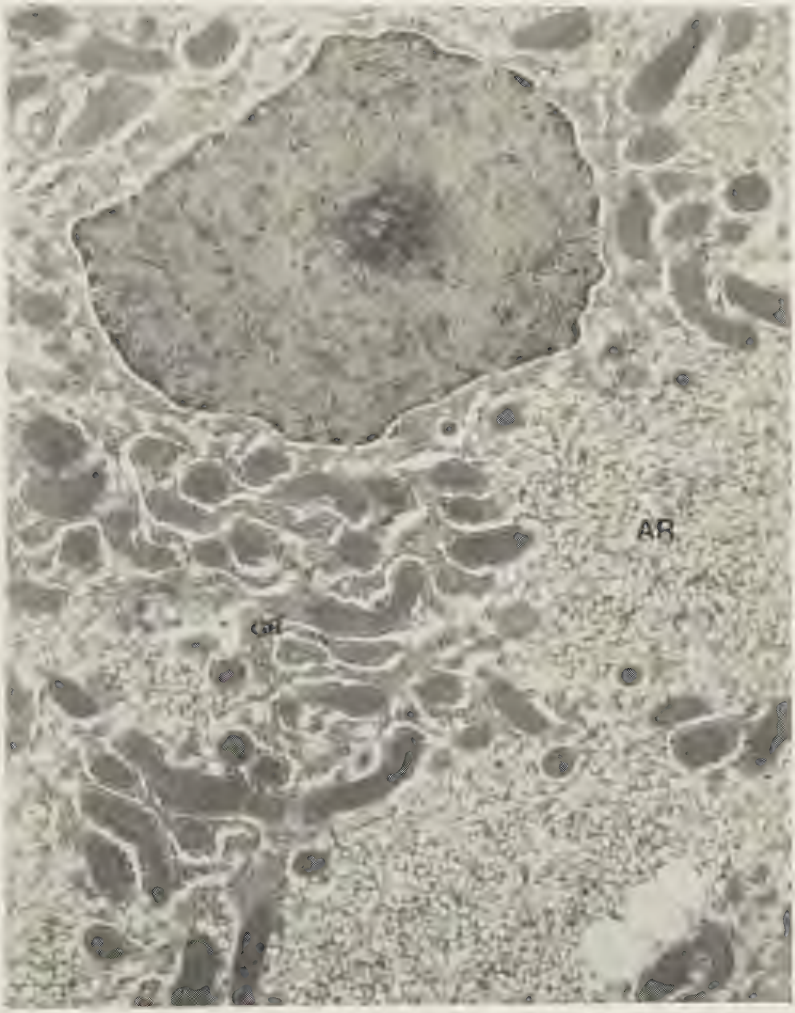

Abb. 5

In manchen dieser Leberzellen mit reichlich agranulärem endoplasmatischem Retikulum sind die Veränderungen geringer ausgeprägt.Dabei finden sich mehr oder weniger umfangreiche Ansammlungen von nur teilweise zerfallenden tubulären und vesikulären Elementen des agranulären endoplasmatischen Retikulums gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt (Abb.6).Besonderes Merkmal dieser Zellen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen,stärker geschädigten Hepatocyten desselben Typs ist,daß in den Lücken des agranulären Maschenwerks Glykogenpartikel zu erkennen sind.Das Glykogen zeigt häufig eine auffallend geringe Elektronendichte und ist meist in einer feinkörnigen,monopartikulären Form,manchmal aber auch in Form typischer Rosetten anzutreffen (Abb.6,Einsatz).Die Mitochondrien liegen überwiegend in kleinen Gruppen dicht beieinander und zeigen abgesehen von einer leichten Verdichtung ihrer Matrix keine auffallenden Veränderungen.Gelegentlich kommen stark eleongierte oder verzweigte Mitochondrien vor.Auch in diesen Zellen ist das granuläre endoplasmatische Retikulum nur spärlich entwickelt, und nur äußerst selten sind mehrere Zisternen parallel zueinander gelagert.Jedoch sind die Membranen der granulären Zisternen im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen,stärker geschädigten Hepatocyten noch bruchstückhaft erhalten.Auch die Sacculi und Vesikel des Golgi-Apparates sowie Lysosomen und Mikrokörper lassen sich bei diesen Zellen identifizieren, obwohl die Membranen dieser Organellen manchmal unscharf gezeichnet sind.Unterschiedlich große Lipidtropfen von geringer Osmiophilie und ohne Membranbegrenzung kommen verstreut im Cytoplasma dieser Zellen vor.Bei den Zellkernen fällt auf,daß die Membranen der Kernhülle wie die des endoplasmatischen Retikulums noch teilweise erhalten sind.Der Nukleolus ist vergleichsweise noch stärker vergrößert.Er zeigt nur eine leichte Verdichtung seiner Strukturen mit vereinzelten,kleinen,stark osmiophilen Arealen.Die Zellmembran dieser Hepatocyten ist meist gut abgrenzbar.Mikrovilli und Desmosomen sind dabei weitgehend unauffällig ausgebildet.

Abb.6 Elektronenmikroskopisches Bild einer Leberzelle mit reichlich agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzelle) auf einer intermediären Stufe der Degeneration in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Auffallend sind die weitgehend unveränderten Mitochondrien (M) inmitten von teilweise noch erkennbaren Vesikeln und Tubuli des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR).Vergrößerter Nukleolus (Nc) mit vereinzelten Verdichtungen seiner Strukturen.

Einsatz: Ausschnitt aus einem weniger stark degenerierten Cytoplasmabezirk dieser Leberzelle bei stärkerer Vergrößerung.Gezeigt ist die Verteilung von Glykogenpartikeln in den Lücken des agranulären Maschenwerks.

Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 20 000 x, Einsatz: 60 000 x)

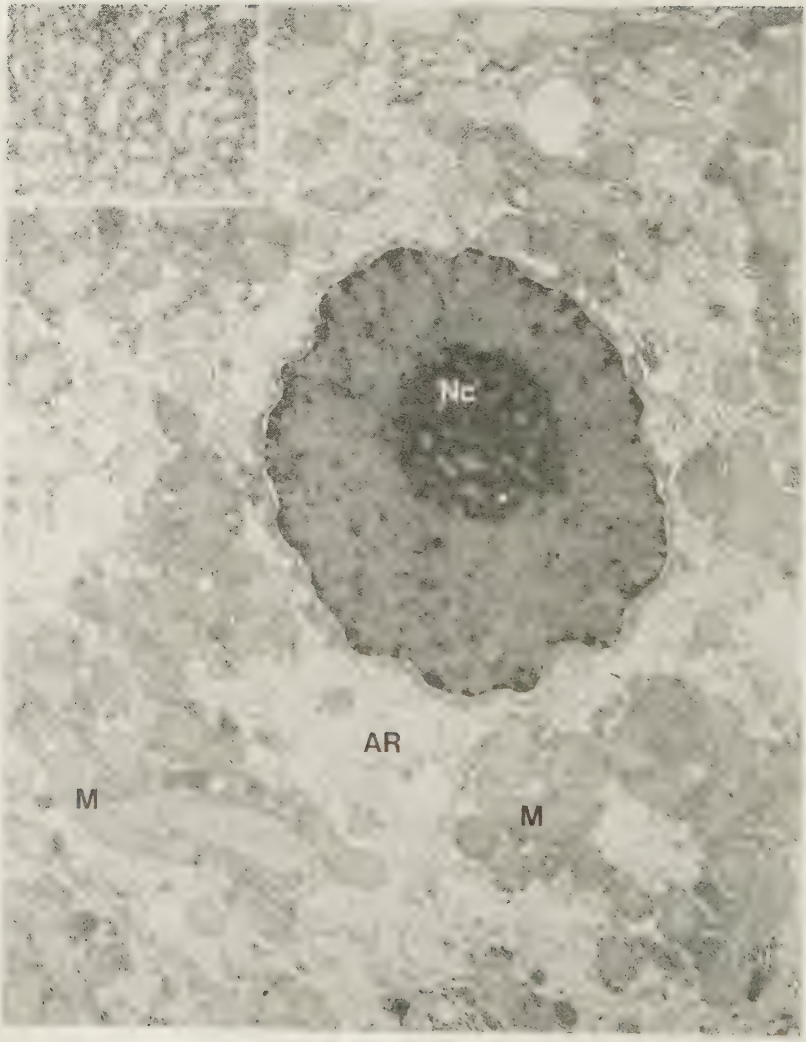

Abb. 6

Zwischen den großen Leberzellen lassen sich auch im elektronenmikroskopischen Bild vereinzelt Hepatocyten in mitotischer Teilung beobachten (Abb.7).In der Übersichtsaufnahme sind sie durch eine im Vergleich zu ihren Nachbarzellen deutlich geringere Elektronendichte charakterisiert.Einige mehr oder weniger ausgedehnte Bezirke der Zellperipherie sind von einem Netzwerk zum Teil erweiterter tubulärer und vesikulärer Membranformationen des agranulären endoplasmatischen Retikulums ausgefüllt,wie bei stärkerer Vergrößerung in Abb.8 gezeigt ist.Um das Chromosomenareal herum kommen zahlreiche,unverändert erscheinende Mitochondrien vor,die häufig in engem Kontakt zu den kurzen,teilweise dilatierten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums stehen.Zwischen diesen Strukturen finden sich gelegentlich teils mit Ribosomen besetzte,teils davon freie Vesikel,welche manchmal ein schwach osmiophiles Material enthalten. Freie Ribosomen sind vorwiegend zwischen den Strukturen des granulären endoplasmatischen Retikulums zu beobachten. Während ein gut entwickelter Golgi-Apparat,Lysosomen und Mikrokörper meistens vorhanden sind,können Glykogenpartikel kaum identifiziert werden.Das Chromosomenareal läßt selbst bei starker Vergrößerung keine pathologischen Veränderungen erkennen (Abb.9).
Bei Hepatocyten in mitotischer Teilung,welche sich in Nachbarschaft zu stark vakuolisierten Leberzellen befinden,besteht die Zellperipherie meist aus hochgradig erweiterten Zisternen und Vesikeln des granulären endoplasmatischen Retikulums.Dabei sind die Membranen nur spärlich mit Ribosomen besetzt (Abb.10).Die Sacculi und Vesikel des Golgi-Apparates sind ebenfalls dilatiert (Abb.10,Einsatz),und das Grundplasma zwischen den Organellen ist meist besonders stark aufgelockert. Agranuläres endoplasmatisches Retikulum ist nicht zu erkennen.Die übrigen Bestandteile dieser Leberzellen in Mitose wie Mitochondrien und die Zellmembran zeigen

keine auffälligen Veränderungen.

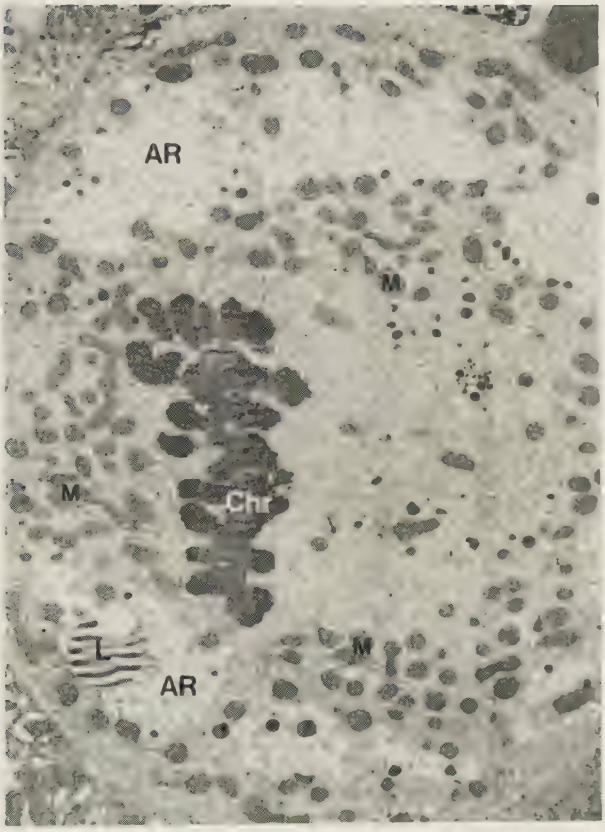

Abb.7 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Leberzelle in Mitose in einem frühen Knoten 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.In der Zellperipherie tubuläre Netzwerkformationen des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR).Im Zentrum die Chromosomen (Chr) umgeben von Mitochondrien (M) und Elementen des granulären endoplasmatischen Retikulums.Vereinzelt Lipidtropfen (L). Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 10 000 x)

Abb.8 Ausschnitt aus der Peripherie der Leberzelle in Mitose in Abb.7 bei stärkerer Vergrößerung.Loses Netzwerk aus zum Teil erweiterten agranulären Tubuli und Vesikeln.
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 60 000 x)

Abb.9 Ausschnitt aus dem Zentrum der Leberzelle in Mitose in Abb.7 bei stärkerer Vergrößerung.Intakte Feinstruktur des Chromatins.
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 60 000 x).

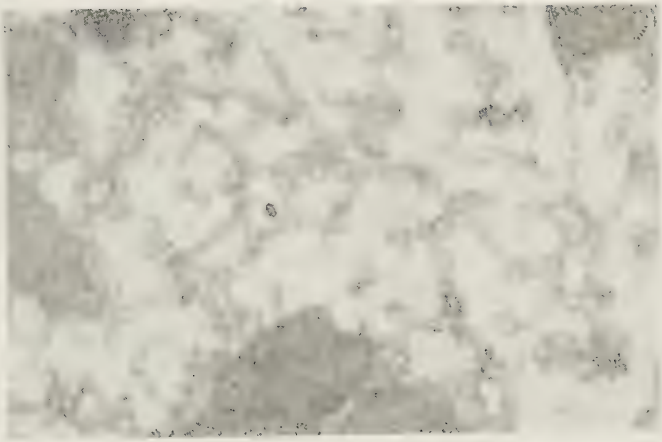

Abb. 8

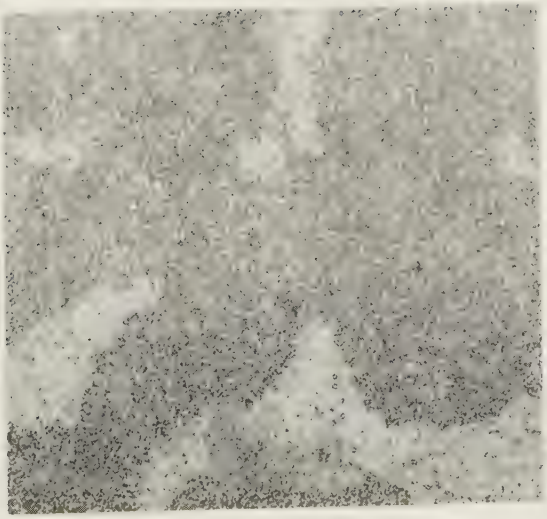

Abb. 9

Abb.10 Ausschnitt aus einer degenerierenden Leberzelle in Mitose in einem frühen Knoten 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1 im elektronenmikroskopischen Bild.Hochgradig erweiterte Zisternen und Vesikel des granulären endoplasmatischen Retikulums mit spärlichem Ribosomenbesatz (↓).Intakte Mitochondrien (M).

Einsatz: Ausschnitt aus demselben Hepatocyten in Mitose.Golgi-Feld mit erweiterten Sacculi und Vesikeln.

Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 60 000 x)

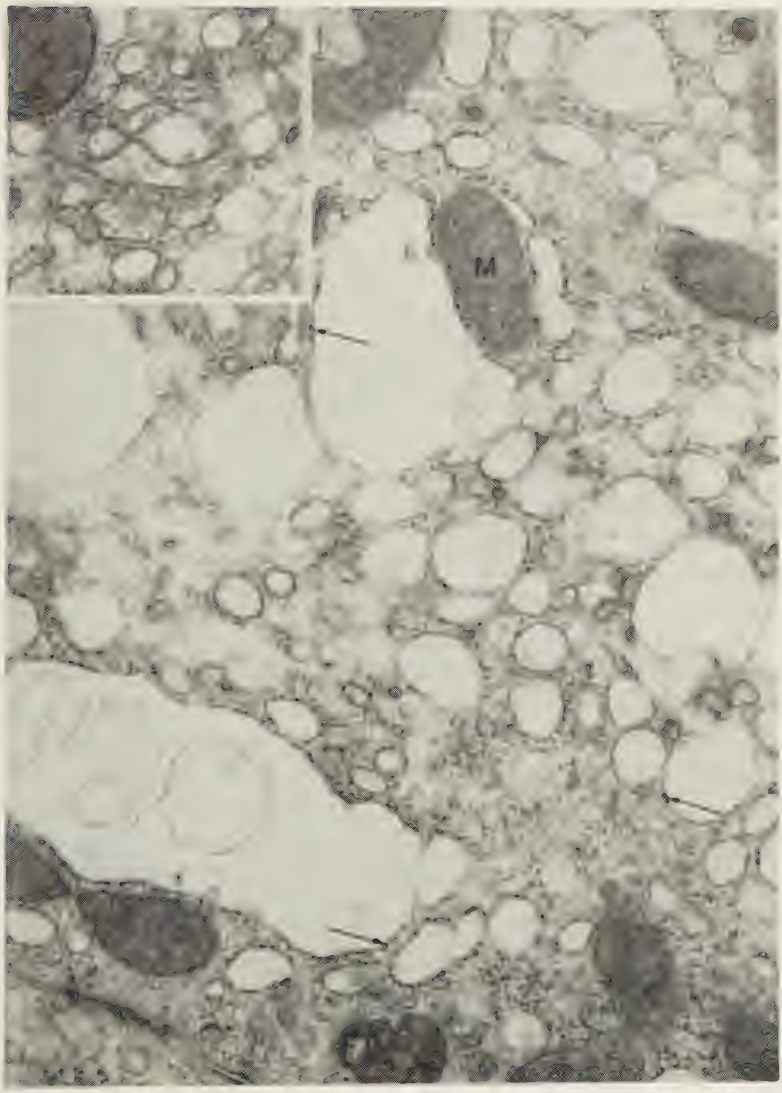

Abb.10

Als Äquivalente der kleinen bis mittelgroßen Hepatocyten lassen sich elektronenmikroskopisch mindestens drei Zelltypen deutlich voneinander abgrenzen: 1. Leberzellen mit reichlich agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen), 2. Leberzellen mit überwiegend granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen) und 3. weitgehend unauffällig erscheinende Leberzellen.

Charakteristisch für die Leberzellen vom Typ 1 ist, daß ausgedehnte Bereiche des Cytoplasmas von überwiegend vesikulären aber auch tubulären Membranformationen des agranulären endoplasmatischen Retikulums ausgefüllt sind (Abb.11).Dabei sind dunkle Glykogenpartikel mit lockerer Verteilung in die Lücken des Maschenwerks eingelassen. Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums in typischer Anordnung sowie unauffällig strukturierte Mitochondrien sind überwiegend auf die Zellperipherie beschränkt.Mikrokörper und Lysosomen lassen ebenfalls keine Strukturveränderungen erkennen.Die Golgi-Felder hingegen fallen nicht nur durch ihre Größe auf,sondern auch dadurch, daß das Innere der Sacculi und Vesikel elektronenoptisch leer erscheint,und die begrenzenden Membranen gelegentlich etwas unscharf gezeichnet sind.Der Zellkern weist keinerlei Veränderungen auf,weder an den Membranen der Kernhülle, noch im Karyoplasma.Auch die Zellmembran entlang der unverändert engen Interzellularspalten ist intakt und zeigt unauffällig ausgebildete Mikrovilli und Desmosomen.

Abb.11 Elektronenmikroskopisches Bild von Typ 1 der kleinen bis mittelgroßen Hepatocyten (AR-reiche Leberzellen) in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Cytoplasma größtenteils bestehend aus agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR) und reichlich in den Maschen des AR verteilten dunklen Glykogenpartikeln.Nur in der Zellperipherie spärliche Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR) in enger räumlicher Beziehung zu den Mitochondrien (M). G= Golgi-Komplex.N= Zellkern. Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 30 000 x)

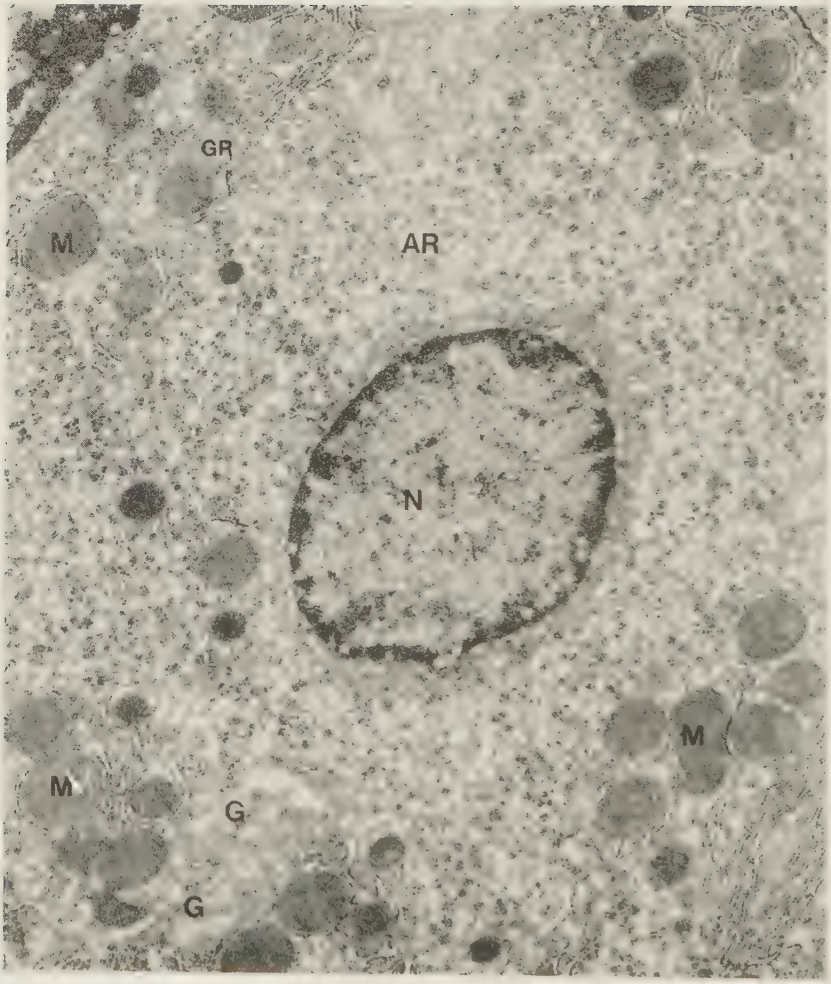

Abb. 11

Das Hauptmerkmal der kleinen bis mittelgroßen Leberzellen vom Typ 2 (GR-reiche Leberzellen) ist,daß weite Teile des Cytoplasmas von dichtgelagerten,leicht erweiterten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums diffus durchzogen werden (Abb.12).Freie Ribosomen finden sich vorzugsweise im Grundplasma zwischen den granulären Zisternen. Außerdem enthalten diese Zellen zahlreiche,vorwiegend rundliche Mitochondrien sowie reichlich prominente Golgi-Komplexe mit erweiterten Sacculi und Vesikeln.In einigen Hepatocyten sind herdförmige Ansammlungen dichtgepackter Glykogenpartikel anzutreffen,die nur spärlich von Profilen des granulären endoplasmatischen Retikulums durchsetzt sind. Weitere Cytoplasmaorganellen,wie Lysosomen und Mikrokörper weisen keine Besonderheiten auf.Der Zellkern ist von leicht unregelmäßiger Gestalt und besteht aus verdichtetem Karyoplasma,in welchem sich verstreut kondensierte Chromatinpartikel sowie ein nur mäßig großer Nukleolus befinden. Die Zellmembran dieser Hepatocyten scheint intakt.

Abb.12 Elektronenmikroskopisches Bild von Typ 2 der kleinen bis mittelgroßen Hepatocyten (GR-reiche Leberzellen) in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Cytoplasma diffus durchzogen von zum Teil erweiterten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR).Herdförmige Anhäufungen von Glykogen (Gl) nur spärlich von agranulären Membranen durchsetzt.Zahlreiche prominente Golgi-Felder (G) mit erweiterten Sacculi und Vesikeln. Unauffällige Mitochondrien (M).Unregelmäßig begrenzter Zellkern (N) mit zahlreichen kondensierten Chromatinpartikeln (↓).Mäßig großer Nukleolus (Nc). Gk= Gallekanälchen.
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 20 000 x)

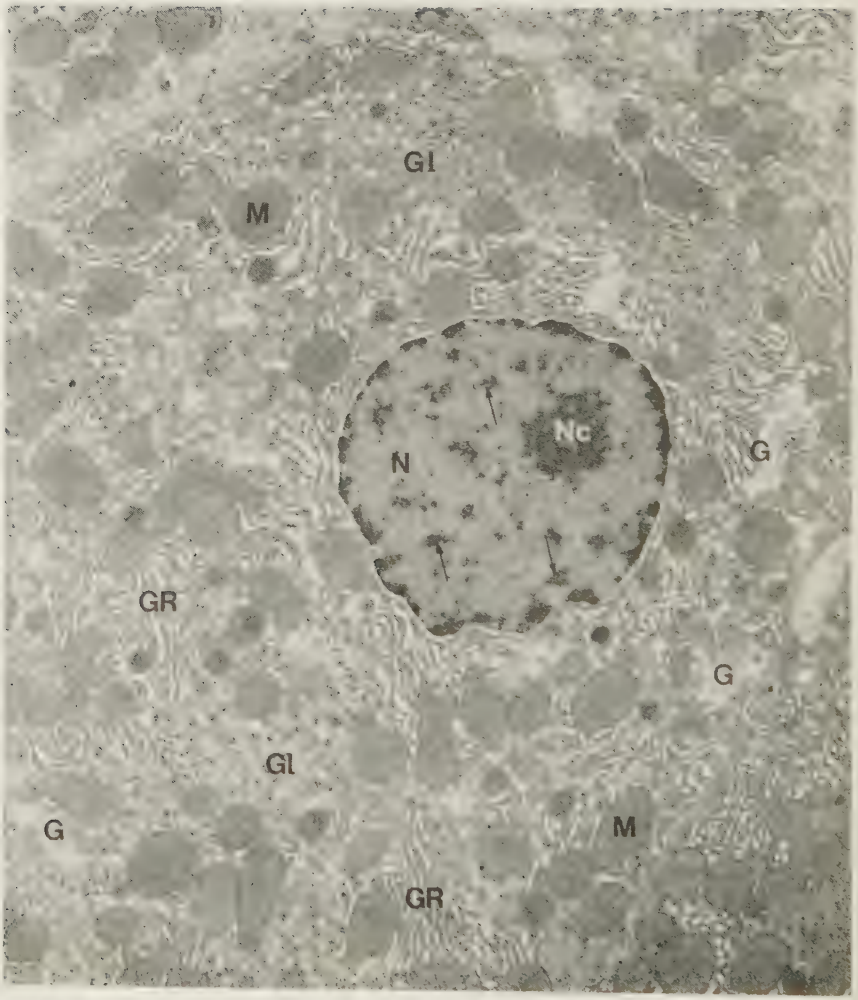

Abb. 12

Manche der kleinen bis mittelgroßen Leberzellen weisen sowohl ein gut entwickeltes granuläres endoplasmatisches Retikulum als auch eine Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums auf (Abb.13).Dabei finden sich zwischen den Tubuli und Vesikeln des agranulären endoplasmatischen Retikulums rosettenförmige Glykogenpartikel in ähnlicher Verteilung wie bei den kleinen bis mittelgroßen Leberzellen vom Typ 1.

Abb.13 Elektronenmikroskopisches Bild einer kleinen bis mittelgroßen Leberzelle in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Kennzeichnend ist die gleichzeitige Vermehrung sowohl des granulären (GR) als auch des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 24 000 x)

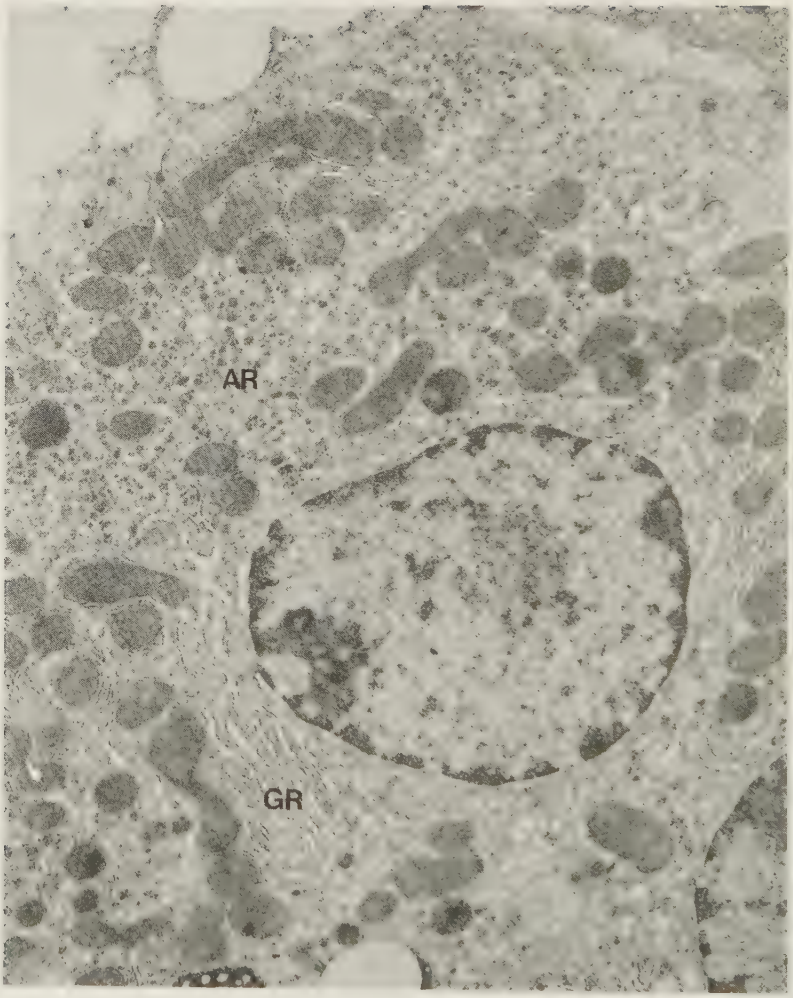

Abb.13

Bei den Leberzellen vom Typ 3,deren Feinstruktur weitgehend dem Befund bei den Kontrolltieren entspricht,fällt besonders auf,daß die Interzellularspalten zum größten Teil erweitert sind (Abb.14).Ein pathologischer Befund hinsichtlich der Struktur der Zellorganellen kann nur an den Mitochondrien erhoben werden,welche gelegentlich eine ungewöhnliche Anordnung ihrer Innenmembran erkennen lassen.Dabei erreichen die Cristae meist die Länge des Mitochondrienlängsdurchmessers und sind in Form eines Lamellenstapels parallel zur Außenmembran angeordnet.

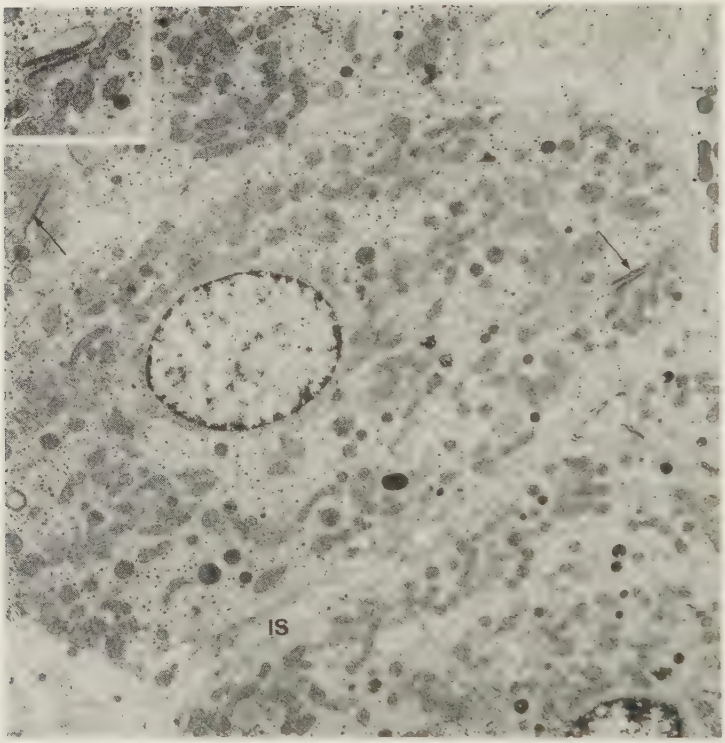

Abb.14 Elektronenmikroskopisches Bild von Typ 3 der kleinen bis mittelgroßen Hepatocyten (weitgehend unauffällig erscheinende Leberzelle) in einem frühen Knoten 56 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Erweiterter Interzellularspalt (IS). Einzelne Mitochondrien mit veränderter Anordnung ihrer Innenmembran (↓) wie im Einsatz bei stärkerer Vergrößerung gezeigt.
Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 12 000 x, Einsatz: 36 000 x)

Selten ist ein weiterer Typ von kleinen Hepatocyten zu beobachten,die eine rundliche Gestalt haben und isoliert zwischen den größeren Leberzellen liegen (Abb.15).Wie die Hepatocyten in Mitose weisen sie in der Übersichtsaufnahme eine deutlich geringere Elektronendichte auf als die sie umgebenden Leberzellen.Im Cytoplasma ist das granuläre endoplasmatische Retikulum gut entwickelt,wobei hie und da granuläre Zisternen stapelförmig angeordnet sind.Zahlreiche freie Ribosomen sind gleichmäßig verteilt im Grundplasma zwischen den Organellen anzutreffen.Mitochondrien,Mikrokörper und Lysosomen lassen keine auffallenden Veränderungen erkennen.Die Sacculi und Vesikel des Golgi-Apparates,welche mit schwach elektronendichtem Material gefüllt sind,erscheinen leicht erweitert.Auch spärlich mit Ribosomen besetzte Vesikel werden beobachtet,während Elemente des agranulären endoplasmatischen Retikulums und Glykogenpartikel kaum zur Darstellung kommen.Vereinzelt sind annähernd strukturfreie Bezirke zu erkennen,die ohne scharfe Grenze in die organellenreichen Zonen des Cytoplasmas übergehen.Der Zellkern,in welchem zahlreiche verdichtete Chromatinpartikel zu finden sind ist meist von abgerundeter Form. Diese Hepatocyten sind von einer intakten Zellmembran umgeben und grenzen eng an ihre Nachbarzellen an.

Abb.15 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines kleinen Hepatocyten von rundlicher Gestalt in einem frühen Knoten 51 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Die Zelle zeigt eine deutlich geringere Elektronendichte als die Nachbarzellen.Reichlich granuläres endoplasmatisches Retikulum (GR) sowie herdförmige,annähernd strukturlose Cytoplasmabezirke (*).Zellkern (N) mit zahlreichen kondensierten Chromatinpartikeln (↓). Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 15 000 x)

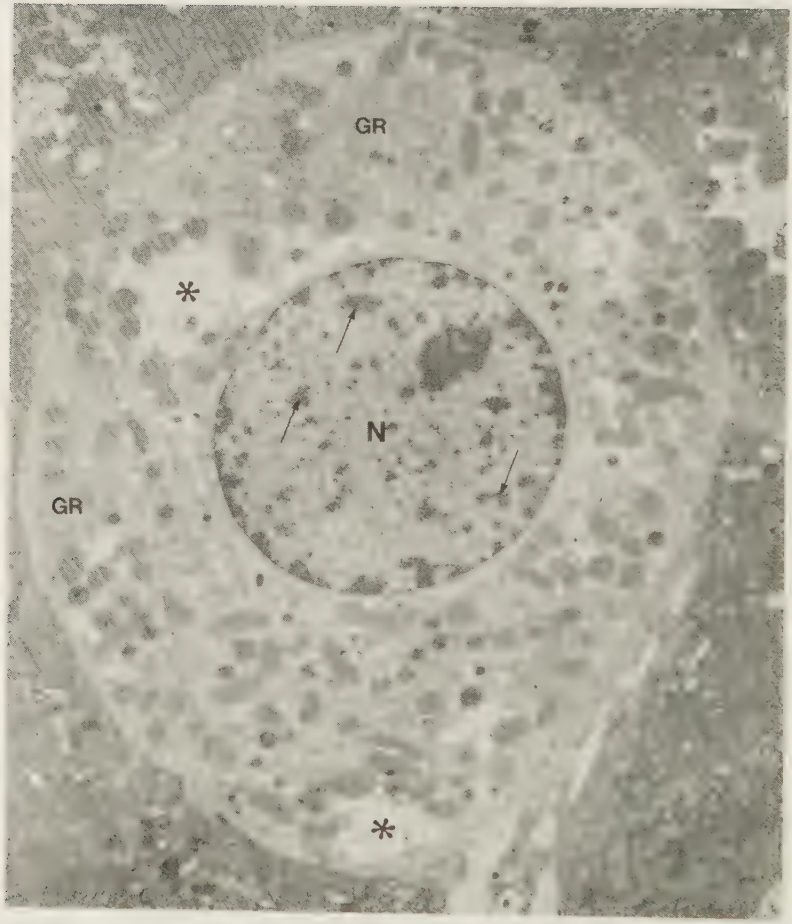

Abb. 15

2.2 Mittlere Knoten

Nach einem Zeitintervall von 29 Wochen in Versuch I und 22 Wochen in Versuch II,während dessen Strukturen wie die frühen Knoten nicht mehr in der Leber anzutreffen sind, treten erneut knotenförmige Gebilde auf.Diese unterscheiden sich jedoch deutlich von den frühen Knoten und werden aufgrund der eingangs erwähnten Einteilungskriterien (siehe bitte Seite 10) als mittlere Knoten bezeichnet.Sie stellen ähnlich wie die frühen Knoten nur eine vorübergehende Erscheinung dar und sind in Versuch I zwischen 85 und 92 Wochen und in Versuch II zwischen 60 und 65 Wochen nach Absetzen des Carcinogens anzutreffen.Bezogen auf den jeweiligen Versuchsbeginn (Tab.2) ergibt sich bis zum Auftreten der mittleren Knoten ein Zeitraum von 93 Wochen in Versuch I und 72 Wochen in Versuch II.

2.2.1 Makroskopie

Makroskopisch erscheinen die mittleren Knoten deutlich über die Leberoberfläche erhaben.Sie sind mehr gelblich als rötlich gefärbt und haben einen Durchmesser von 6 bis 8 mm.

2.2.2 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopisch ist zu erkennen,daß die mittleren Knoten deutlich durch eine Schicht komprimierten Lebergewebes vom umgebenden Parenchym abgegrenzt sind (Abb.16). Sie unterscheiden sich von den frühen Knoten besonders dadurch,daß sie aus einer homogenen Population verhältnismäßig großer Leberzellen bestehen (Abb.17).Die normale Struktur der Zellbalken und der Leberläppchen ist dabei fast vollständig aufgehoben,und statt dessen finden sich meist Epithelverbände,die nur spärlich von Sinusoiden durchsetzt sind.Die Hepatocyten fallen besonders im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparat durch relativ schwach tingierte Zellkerne auf,welche vergleichsweise große Nukleoli enthalten.Die cytoplasmatische Substanz färbt

Abb.16 Ausschnitt aus einem mittleren Knoten (K) in der Rattenleber 85 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1 im lichtmikroskopischen Bild.Deutliche Kompression des angrenzenden Lebergewebes (L).
Färbung: Kresylviolett.(Vergr. 75 x)

Abb.17 Partie aus einem mittleren Knoten der Rattenleber 85 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Knotengewebe bestehend aus einer homogenen Population etwa gleichgroßer Hepatocyten,deren Cytoplasma neben stark angefärbten Anteilen gleichzeitig umfangreiche,kaum tingierte,optisch strukturlose Bezirke enthält.
Semidünnschnitt.Färbung: Methylenblau.(Vergr. 1000 x)

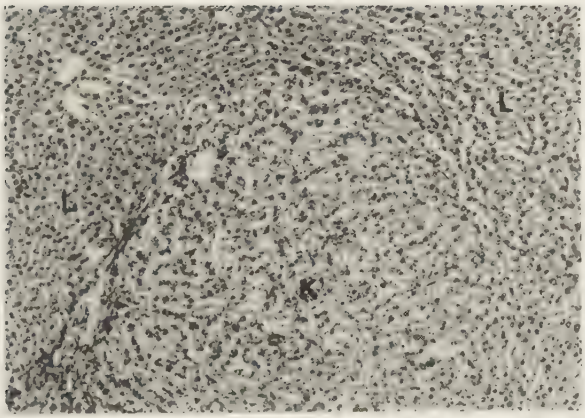

Abb. 16

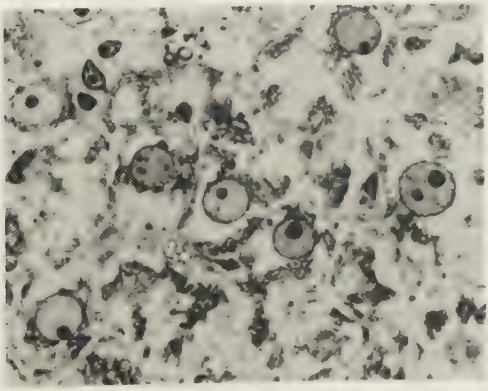

Abb. 17

sich mit Hämatoxylin-Eosin ungleichmäßig an und erweist sich nach Färbung mit Kresylviolett oder Methylenblau in manchen Partien als deutlich basophil (Abb.17).Vorzugsweise in der Zellperipherie kommen mehr oder weniger umfangreiche strukturlose Bezirke vor.Hepatocyten in Mitose weisen ähnliche lichtmikroskopische Merkmale auf.

2.2.3 Elektronenmikroskopie

Auch elektronenmikroskopisch lassen die Hepatocyten innerhalb der mittleren Knoten gemeinsame Merkmale erkennen. Dazu gehört neben den bereits lichtmikroskopisch auffallend großen Nukleoli eine deutliche Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums.Jedoch können zwei Varianten dieser Hepatocyten mit reichlich endoplasmatischem Retikulum voneinander unterschieden werden: 1. Leberzellen mit einer Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR-reiche Leberzellen) und 2. Leberzellen mit fast ausschließlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen).

Die Leberzellen der Variante 1 sind dadurch charakterisiert,daß umfangreiche Bezirke des Cytoplasmas von Ansammlungen überwiegend vesikulärer aber auch tubulärer Elemente des agranulären endoplasmatischen Retikulums ausgefüllt sind (Abb.18).Auch zwischen den übrigen Zellbestandteilen sind zahlreiche kleinere Gruppen dichtgelagerter Vesikel oder selten auch Tubuli des agranulären endoplasmatischen Retikulums anzutreffen.Das granuläre endoplasmatische Retikulum ist deutlich reduziert,läßt jedoch meist eine typische Anordnung erkennen.Die Membranen sowohl des agranulären als auch des granulären endoplasmatischen Retikulums sind in vielen dieser Zellen unscharf gezeichnet.Ähnliche Veränderungen sind auch an den Membranen des Golgi-Apparates zu beobachten.Die Golgi-Felder fallen außerdem dadurch auf, daß das Innere der Sacculi und Vesikel elektronenoptisch leer erscheint.Die Mitochondrien hingegen lassen kaum

Veränderungen ihrer Membranen erkennen.Sie weisen aber eine unterschiedliche Elektronendichte ihrer Matrix auf. Mikrokörper und Lysosomen sind vorhanden und zeigen keine pathologischen Veränderungen.Glykogenpartikel lassen sich kaum identifizieren.Die Zellkerne sind häufig mit leichten Einziehungen versehen,wobei der perinukleäre Spalt gering erweitert erscheint.Im Kerninnern fällt besonders die starke Osmiophilie des vergrößerten Nukleolus sowie eine deutliche Verdichtung des Karyoplasmas auf,in welchem verstreut kondensierte Chromatinpartikel sowie Perichromatingranula vorkommen.Die Zellmembran ist abschnittweise zerfallen,so daß die Mikrovilli zum Teil nicht deutlich zu erkennen sind.

Hepatocyten mit ähnlichen ultramikroskopischen Merkmalen sind auch in Randbereichen der mittleren Knoten zu beobachten.Durch die Kompression des Gewebes bedingt kann es bei solchen Zellen zu einer deutlichen Verformung des gesamten Zelleibs wie auch des Zellkerns kommen (Abb.19).Jedoch sind in diesen Hepatocyten die degenerativen Veränderungen an sämtlichen Organellen sowie an der Zellmembran meist deutlich geringer ausgeprägt.

Abb.18 Elektronenmikroskopisches Bild eines Hepatocyten der Variante 1 (AR-reiche Leberzelle) in einem mittleren Knoten 86 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Charakteristische Ansammlungen überwiegend vesikulärer Elememte des agranulären endoplasmatischen Retikulums (AR),deren Membranen meist unscharf gezeichnet sind.GR= Granuläres endoplasmatisches Retikulum.M= Mitochondrien.G= Golgi-Feld.Ly= Lysosomen.Unregelmäßig begrenzter Zellkern (N) mit verdichtetem Karyoplasma und einem vergrößerten Nukleolus (Nc).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 19 000 x)

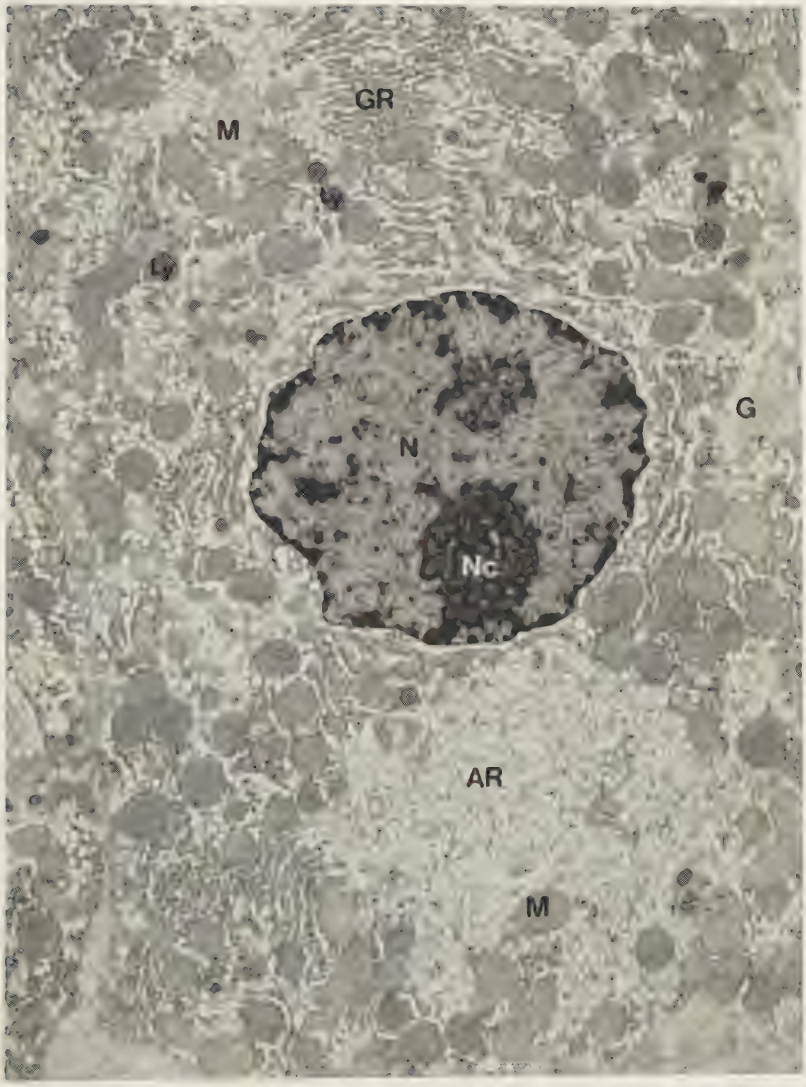

Abb 18

Abb.19 Ausschnitt aus einer Leberzelle im Randbereich eines mittleren Knotens 86 Wochen nach Absetzen Aflatoxin B_1. Auffallend ist die Verformung der Zelle - bedingt durch die in diesem Gewebebezirk vorhandene Kompression.
Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 20 000 x)

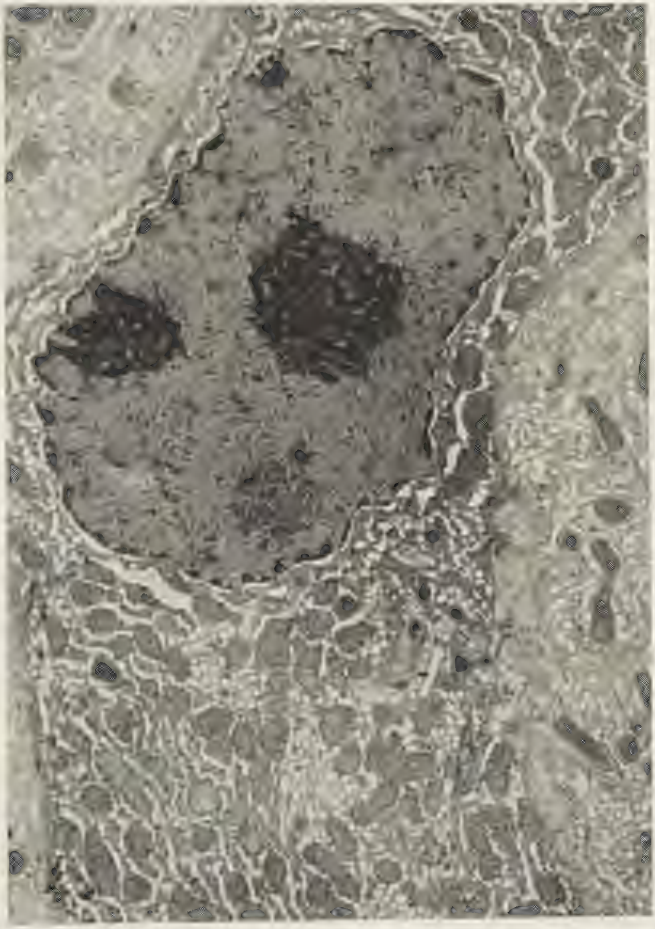

Abb. 19

Die Leberzellen der Variante 2 (GR-reiche Leberzellen) sind dadurch gekennzeichnet,daß der größte Teil des Cytoplasmas fast ausschließlich aus hochgradig verzweigten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums und gleichmäßig dazwischen verteilten Mitochondrien ausgefüllt ist,wobei die beiden cytoplasmatischen Komponenten nicht nur stark vermehrt sind,sondern auch ausgeprägte degenerative Veränderungen zeigen (Abb.20). Bei einigen dieser Hepatocyten kommen in der Zellperipherie elektronenoptisch weitgehend leere Bezirke von unterschiedlicher Ausdehnung vor,in denen nur spärliche Reste zerfallender Membranen anzutreffen sind.Elememte des agranulären endoplasmatischen Retikulums,Golgi-Felder und Glykogenpartikel sind nicht zu identifizieren.In den organellenreichen Cytoplasmaregionen ist bei stärkerer Vergrößerung zu erkennen,daß die begrenzenden Membranen der meist leicht erweiterten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums größtenteils vollständig fehlen (Abb.21).Die Ribosomen hingegen befinden sich abschnittweise noch in typischer Anordnung entlang der granulären Zisternen und scheinen daher dem elektronenoptisch leeren Lumen unmittelbar anzuliegen.Die Mitochondrien fallen besonders durch ihre stark verdichtete Matrix auf,in welcher die Cristae nur als elektronenoptisch leere Spalträume zu erkennen sind. Zum Teil stellt sich kaum eine Innenstruktur dar,so daß die Mitochondrien sich nicht deutlich von Mikrokörpern und Lysosomen unterscheiden lassen.Im Grundplasma sind angedeutet zahlreiche elektronendichte Granula zu beobachten,die morphologisch nicht eindeutig als Ribosomen identifiziert werden können.Die Zellkerne sind meist rundlich oder leicht oval gestaltet.Das Karyoplasma enthält verstreut kondensierte Chromatinpartikel.Die Nukleoli sind besonders stark vergrößert und zeigen neben einem netzförmigen Aufbau eine fleckförmige Verdichtung ihrer fibrillären Komponente (Abb.22).

SVOBODA und HIGGINSON haben bereits 1968 über ähnliche Beobachtungen im Zusammenhang mit der Lebercarcinogenese bei fortlaufender Gabe von Aflatoxin B_1 oder anderen Carcinogenen berichtet und dieses Phänomen einer gewissen, örtlich begrenzten räumlichen Trennung der fibrillären und granulären Anteile des Nukleolus als "Mikrosegregation" bezeichnet.
Bei den meisten dieser Hepatocyten ist ein fast vollständiger Verlust der Zellmembran zu beobachten, so daß zwei benachbarte Zellen nur durch einen elektronenoptisch leeren Spaltraum voneinander getrennt scheinen. Mikrovilli und Desmosomen sind dadurch ebenfalls zum Teil nur andeutungsweise zu erkennen.

Abb.20 Elektronenmikroskopisches Bild von Ausschnitten aus zwei degenerierenden Hepatocyten der Variante 2 (GR-reiche Leberzellen) in einem mittleren Knoten 86 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Cytoplasma fast ausschließlich bestehend aus degenerativ veränderten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums und dazwischengelagerten Mitochondrien. Elektronenoptisch leere Cytoplasmabezirke in der Zellperpherie (*).Im Zellkern (N) prominenter Nukleolus (Nc).Vollständiger Verlust der Zellmembran (↓).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 12 000 x)

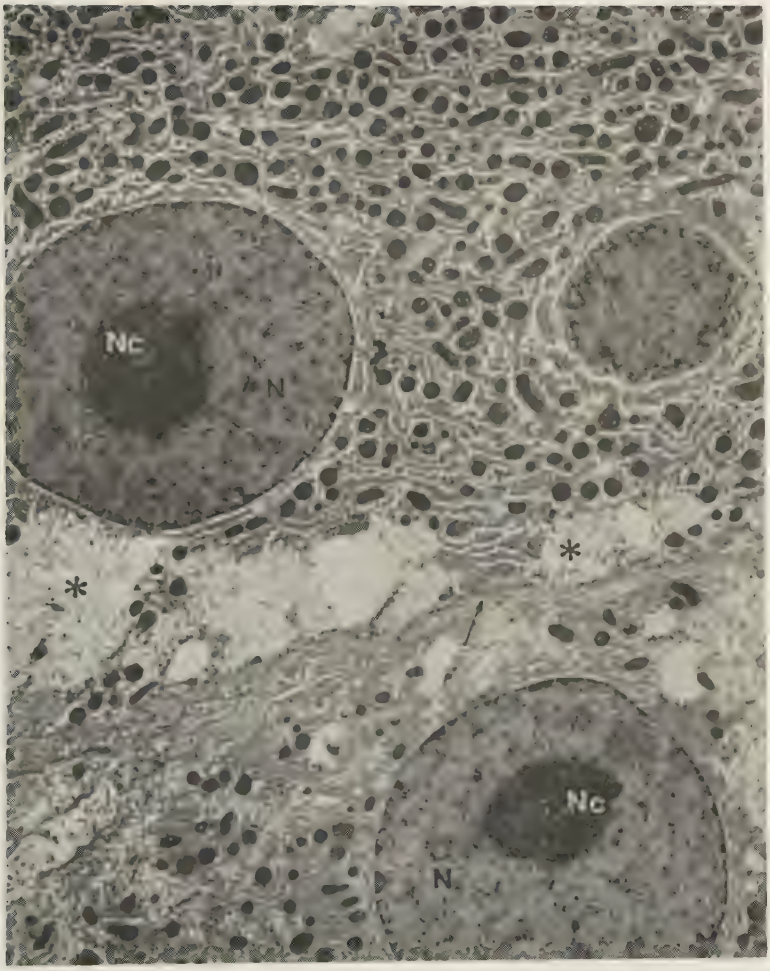

Abb. 20

Abb.21 Ausschnitt aus einer degenerierenden Leberzelle der Variante 2 (GR-reiche Leberzelle) in einem mittleren Knoten 86 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Im Zellkern (N) stark vergrößerter, netzförmiger Nukleolus (Nc) mit fleckförmigen Verdichtungen seiner Strukturen.Im Cytoplasma zahlreiche Mitochondrien (M) mit verdichteter Matrix.Dazwischen reichlich granuläre Zisternen, deren begrenzende Membranen größtenteils nicht zu erkennen sind.
Uranylycetat und Bleizitrat.(Vergr. 30 000 x)

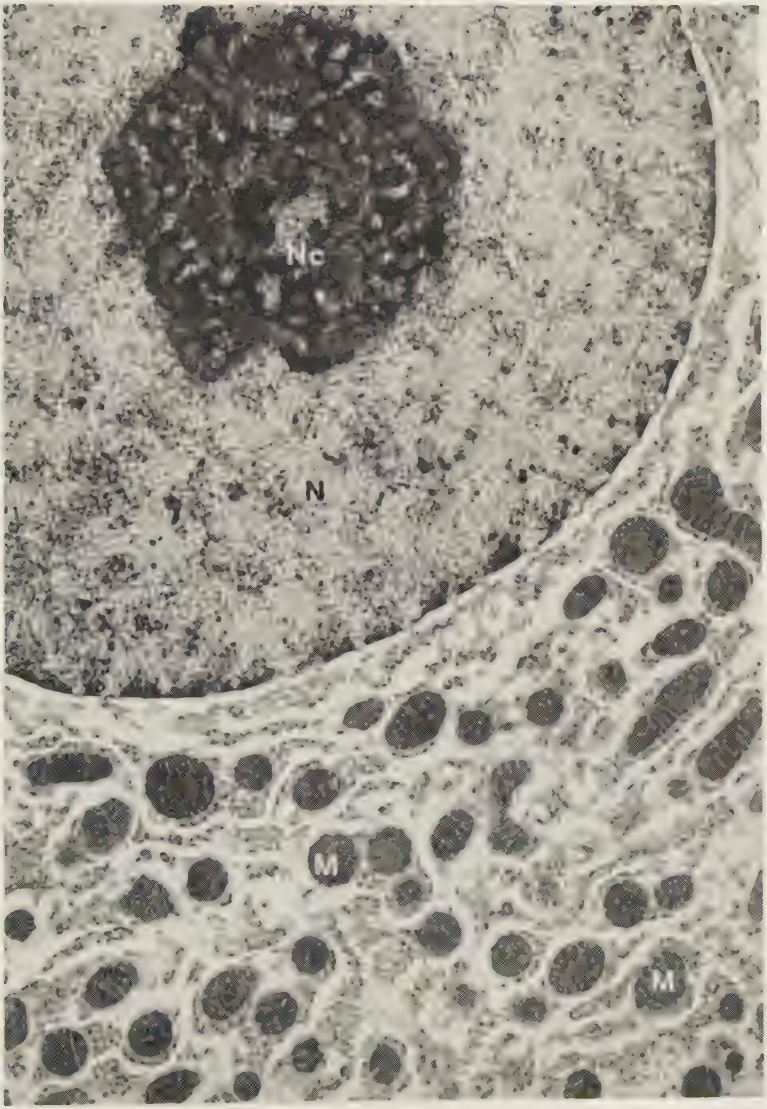

Abb. 21

Abb.22 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nukleolus aus einer degenerierenden Leberzelle mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzelle) in einem mittleren Knoten 86 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Zonale Verdichtung der fibrillären Komponente (↓). Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 60 000 x)

Abb. 22

2.3 Späte Knoten

Nach dem Verschwinden der mittleren Knoten folgt ein Zeitintervall von etwa 9 Wochen in Versuch I und 6 Wochen in Versuch II,während dessen wiederum keinerlei knotenartige Veränderungen an der Leber nachweisbar sind.Danach treten noch einmal knotenförmige Gebilde auf,die sich jedoch sowohl von den frühen als auch von den mittleren Knoten deutlich unterscheiden,und aufgrund der eingangs erwähnten Einteilungskriterien (siehe bitte Seite 10) als späte Knoten bezeichnet werden.Sie sind in Versuch I zwischen 101 und 108 Wochen und in Versuch II zwischen 71 und 84 Wochen nach Absetzen des Carcinogens anzutreffen.Bezogen auf den jeweiligen Versuchsbeginn (Tab.2) ergibt sich bis zum Auftreten der späten Knoten ein Zeitraum von 109 Wochen in Versuch I und 83 Wochen in Versuch II.

2.3.1 Makroskopie

Die späten Knoten liegen meist dicht nebeneinander an der Leberoberfläche,treten aber manchmal ähnlich wie die frühen und mittleren Knoten nur vereinzelt auf.In der Regel sind sie etwas erhaben und von weißlich-grauer Farbe. Ihr Durchmesser variiert zwischen 2 und 10 mm.

2.3.2 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopisch ist zu erkennen,daß auch die späten Knoten in ihrer Peripherie von einer Schicht deutlich komprimierten Lebergewebes begrenzt werden (Abb.23).Innerhalb der Knoten ist die typische Architektur des Lebergewebes weitgehend aufgehoben.
Sie bestehen aus einer homogenen Population etwa gleichgroßer Hepatocyten,welche besonders in der Kresylviolettfärbung aber auch in der Methylenblaufärbung größtenteils durch eine intensive Basophilie ihres Cytoplasmas gekennzeichnet sind.Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich zwei Varianten basophiler Leberzellen unterscheiden: 1. Leberzellen,die sich durch eine kräftige streifige Basophilie

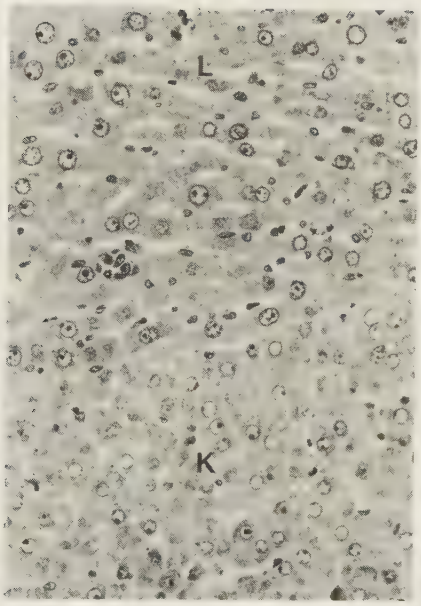

Abb.23 Ausschnitt aus einem späten Knoten (K) der Rattenleber 78 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1 im lichtmikroskopischen Bild.Am Rande deutliche Kompression des angrenzenden Lebergewebes (L). Knotengewebe (K) bestehend aus etwa gleichgroßen, verhältnismäßig gleichmäßig angefärbten Hepatocyten in pathologischer Zellanordnung.
Färbung: Hämatoxylin-Eosin.(Vergr. 250 x)

ihres Cytoplasmas auszeichnen (Abb.24,Einsatz) und 2. Leberzellen,die durch eine mäßige homogene Basophilie des Cytoplasmas charakterisiert sind (Abb.27,Einsatz).Fetthaltige Leberzellen sind ebenfalls gelegentlich anzutreffen (Abb.28, Einsatz).Häufig sind darüberhinaus Leberzellnekrosen zu beobachten,während Mitosen in den späten Knoten nicht vorzukommen scheinen.

2.3.3 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopisch kann den einzelnen lichtmikroskopisch identifizierten Varianten der basophilen Leberzellen und den fetthaltigen Leberzellen jeweils ein bestimmtes Äquivalentbild eindeutig zugeordnet werden.

Die elektronenmikroskopischen Äquivalente der Leberzellen,die sich lichtmikroskopisch durch eine kräftige steifige Basophilie ihres Cytoplasmas auszeichnen,lassen bereits in der Übersichtsaufnahme erkennen,daß das Cytoplasma vorwiegend aus Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums und Mitochondrien besteht (Abb.24).Dabei sind beide Cytoplasmakomponenten nicht nur stark vermehrt sondern auch deutlich degenerativ verändert,so daß diese Zellen eine degenerierte Form von Hepatocyten mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (degenerierende GR-reiche Leberzellen) darstellen.Die Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums sind meist stark erweitert. Um den Zellkern herum sind sie häufig in konzentrischen Lagen angeordnet,und in der Zellperipherie erstrecken sie sich vorwiegend netzartig zwischen den dichtgelagerten Mitochondrien.Das Lumen der granulären Zisternen ist elektronenoptisch leer bis auf feine,fibrilläre Strukturen, die brückenartig über das Zisternenlumen hinweg gespannt sind (Abb.25).Die Membranbegrenzung der Zisternen ist meist nicht zu erkennen,so daß die Ribosomen,welche häufig in unauffälliger Weise angeordnet sind,dem Lumen unmittelbar anliegen.In einigen Bezirken des Cytoplasmas jedoch lassen sich nur kurze Abschnitte degenerativ veränderter Zisternen

des granulären endoplasmatischen Retikulums identifizieren sowie zahlreiche freie Ribosomen,welche überwiegend in Form von Spiralen zu Polysomen vereinigt sind (Abb.26). Daher können die elektronenoptisch leeren Spalträume,von welchen diese Cytoplasmabezirke durchzogen werden,als Reste zerfallener granulärer Zisternen angesehen werden.Die Mitochondrien sind bevorzugt in der Zellperipherie anzutreffen (Abb.24) und zeichnen sich durch eine deutliche Verdichtung ihrer Matrix aus.Dadurch,daß selbst bei stärkerer Vergrößerung die Cristae kaum zu erkennen sind (Abb.25),lassen sich die Mitochondrien weder von Mikrokörpern noch von Lysosomen eindeutig unterscheiden. Strukturen des agranulären endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Felder und Glykogen sind nicht zu identifizieren. Der Zellkern ist meist mit leichten Einziehungen versehen, und der perinukleäre Spalt erscheint etwas erweitert.Im Inneren des Kerns befindet sich ein prominenter Nukleolus, der durch seine starke,zum Teil fleckförmige Osmiophilie auffällt.Auch das Karyoplasma weist eine deutlich vermehrte Elektronendichte auf und enthält verstreut kondensierte Chromatinpartikel.Die Zellmembran ist meist nicht zu erkennen,so daß unmittelbar benachbarte Hepatocyten nur durch einen schmalen,elektronenoptisch leeren Spaltraum voneinander getrennt zu sein scheinen (Abb.25). Gelegentlich kommen Erweiterungen des Interzellularspaltes vor,welche aufgrund dessen,daß sie Strukturen enthalten, die an Mikrovilli erinnern,als Reste von Gallekanälchen anzusehen sind.Außer desmosomenartigen Bezirken vermehrter Elektronendichte an den Zellgrenzen sind auch häufig Verzahnungen der Leberzellen zu beobachten.

Abb.24 Elektronenmikroskopisches Äquivalent einer Leberzelle mit kräftiger streifiger Basophilie des Cytoplasmas (degenerierende GR-reiche Leberzelle) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Starke Vermehrung der größtenteils konzentrisch um den Zellkern herum angeordneten Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR). Zahlreiche Mitochondrien (M) vorwiegend in der Zellperipherie. Im Zellkern (N) auffallend großer Nukleolus (Nc) von deutlich vermehrter Osmiophilie. Trotz vollständigen Verlustes der Zellmembran entlang des Interzellularspaltes (↓) noch angedeutet Strukturen vorhanden, die an Gallekanälchen (Gk) und Desmosomen (D) erinnern.
Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 12 000 x)

Einsatz: Lichtmikroskopisches Bild von Leberzellen mit kräftiger streifiger Basophilie des Cytoplasmas (Variante 1 der basophilen Hepatocyten) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.
Semidünnschnitt. Färbung: Methylenblau. (Vergr. 1000 x)

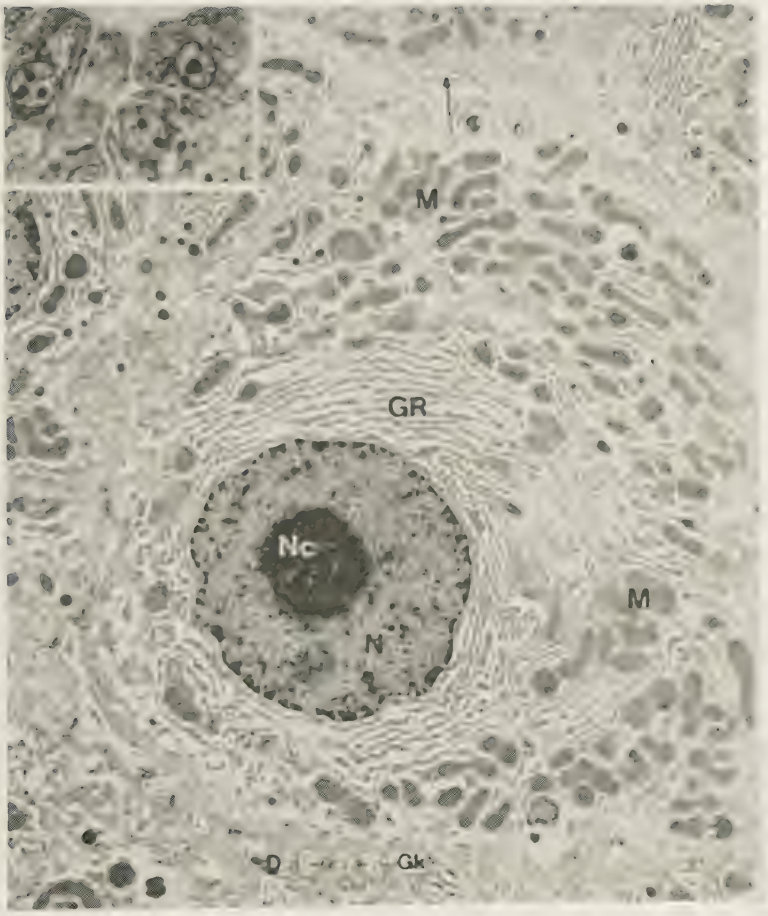

Abb 24

Abb.25 Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer degenerierenden Leberzelle mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (Variante 1 der im lichtmikroskopischen Bild basophilen Hepatocyten) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Auffallende Vermehrung und Degeneration der granulären Zisternen, wobei deren Membranbegrenzungen größtenteils nicht zu erkennen sind. Die Ribosomen scheinen dem von feinen fibrillären Strukturen brückenartig überspannten Zisternenlumen abschnittweise unmittelbar anzuliegen (↓). Mitochondrien (M) mit stark verdichteter Matrix und kaum sich darstellender Innenstruktur.
Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 60 000 x)

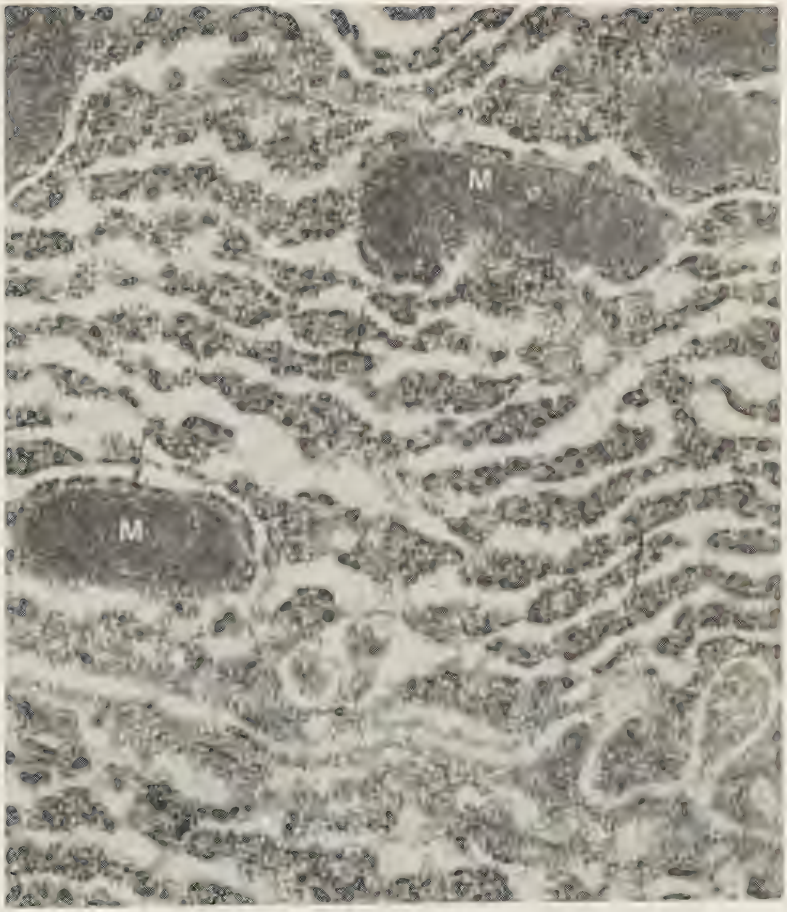

Abb. 25

Abb.26 Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer degenerierenden Leberzelle mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (Variante 1 der im lichtmikroskopischen Bild basophilen Hepatocyten) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1. Von elektronenoptisch leeren Spalträumen durchsetzter Cytoplasmabezirk, in welchem zahlreiche in Spiralen angeordnete Ribosomen (↓) vorkommen. Uranylacetat und Bleizitrat. (Vergr. 60 000 x)

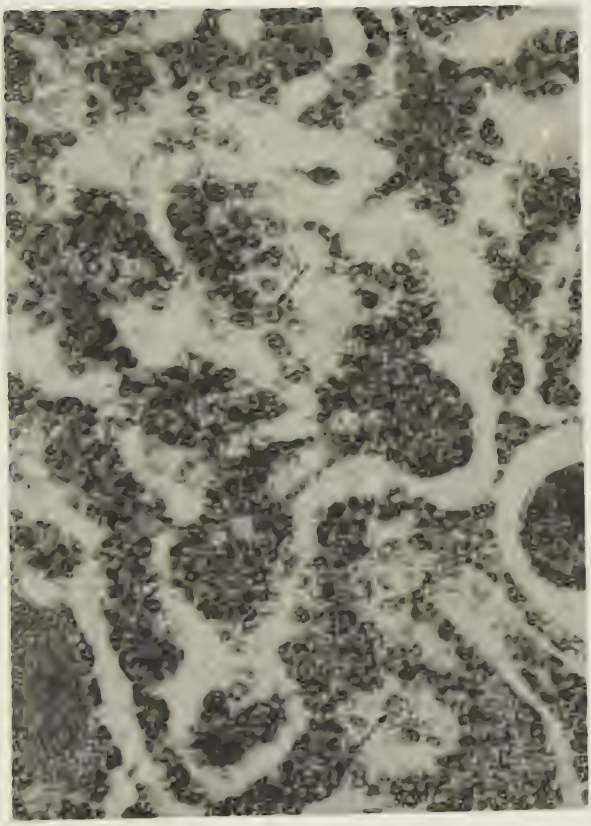

Abb 26

Die elektronenmikroskopischen Äquivalente der Leberzellen,die lichtmikroskopisch durch eine mäßige homogene Basophilie des Cytoplasmas charakterisiert sind,sind dadurch gekennzeichnet,daß das Cytoplasma zum größten Teil aus Mitochondrien besteht (Abb.27).Die Mitochondrien sind meist rundlich oder leicht oval,können jedoch selten auch verzweigt sein.Mitunter erscheint ihre Matrix etwas aufgelockert.Zwischen den Mitochondrien erstrecken sich zahlreiche Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums welche abgesehen von einer leichten Erweiterung ihres Lumens sowie einzelner Unterbrechungen ihrer begrenzenden Membranen keine auffallenden Veränderungen erkennen lassen. Im Grundplasma zwischen dem granulären endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien befinden sich freie Ribosomen.Golgi-Felder sind reichlich entwickelt,und außerdem sind vermehrt lysosomale Körper unterschiedlicher Größe und Gestalt vorhanden.Mikrokörper scheinen nur selten vorzukommen. In einigen dieser Hepatocyten sind vereinzelt Lipidtropfen ohne Membranbegrenzung zu beobachten,die sich durch eine mäßige Osmiophilie ihres Inhalts auszeichnen.Glykogenpartikel sind in der Regel nicht zu identifizieren.Die Zellkerne sind meist unregelmäßig gestaltet,wobei der perinukleäre Spalt stellenweise leicht erweitert erscheint. Im Karyoplasma befinden sich verstreut kondensierte Chromatinpartikel sowie ein meist nur mäßig großer,osmiophiler Nukleolus.Die Zellmembran dieser Leberzellen ist weitgehend intakt.

Abb.27 Elektronenmikroskopisches Äquivalent einer Leberzelle mit mäßiger homogener Basophilie des Cytoplasmas (Variante 2 der im lichtmikroskopischen Bild basophilen Leberzelle) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Dichte Mitochondrienpopulation im Cytoplasma.Zwischen den Mitochondrien (M) zahlreiche Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums (GR).Ly= Lysosomale Körper.G= Golgi-Feld.Im Zellkern (N) stark osmiophiler Nukleolus (Nc).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 20 000 x)

Einsatz: Lichtmikroskopisches Bild von Leberzellen mit mäßiger homogener Basophilie des Cytoplasmas (Variante 2 der basophilen Leberzellen) in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.
Semidünnschnitt.Färbung: Methylenblau.(Vergr. 300 x)

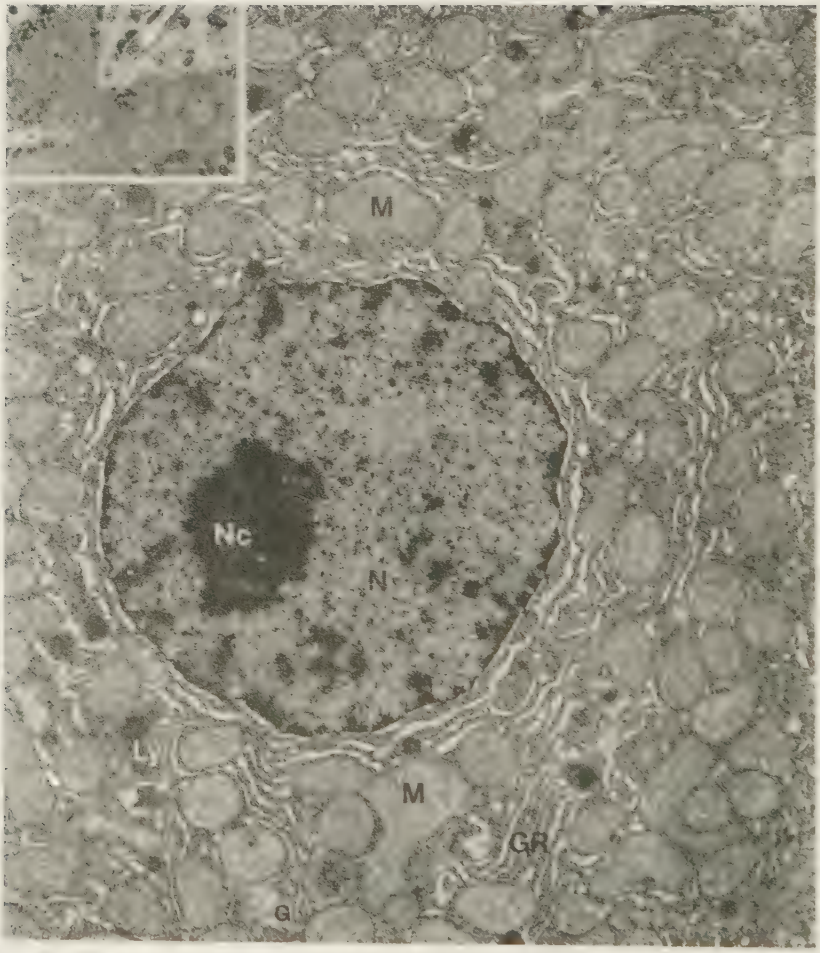

Abb. 27

Die elektronenmikroskopischen Äquivalente der fetthaltigen Leberzellen sind charakterisiert durch zahlreiche rundliche Cytoplasmabezirke von homogener Osmiophilie (Abb.28),welche als unmittelbares Korrelat der Lipidtropfen anzusehen sind.Die Fetttropfen sind unterschiedlich groß, besitzen keine Membranbegrenzung und sind gleichmäßig über das Cytoplasma verteilt.Unter den übrigen Cytoplasmabestandteilen finden sich zahlreiche Mitochondrien,welche gelegentlich eine Verdichtung ihrer Matrix sowie eine Erweiterung einzelner Cristae erkennen lassen.Die ebenfalls meist reichlich vorhandenen Zisternen des granulären endoplasmatischen Retikulums sind in unauffälliger Weise angeordnet und zeigen nur stellenweise eine leichte Erweiterung ihres Lumens sowie einen Zerfall der begrenzenden Membranen in diesen Abschnitten.Außerdem weisen diese Leberzellen manchmal Golgi-Felder und lysosomale Körper auf.Mikrokörper,Strukturen des agranulären endoplasmatischen Retikulums und Glykogen scheinen kaum vorhanden zu sein.Der leicht unregelmäßig gestaltete Zellkern weist in seinem Inneren verstreute,kondensierte Chromatinpartikel auf sowie einen meist nicht sehr großen Nukleolus,welcher sich häufig durch eine starke Osmiophilie auszeichnet.Die Zellmembran zeigt keine auffallenden Veränderungen.

Abb.28 Elektronenmikroskopisches Äquivalent einer fetthaltigen Leberzelle in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Im Cytoplasma neben zahlreichen Lipidtropfen (L) vorwiegend Mitochondrien (M) und granuläres endoplasmatisches Retikulum (GR).Örtliche Erweiterungen der granulären Zisternen stets begleitet von einem Verlust der begrenzenden Membranen in diesen Abschnitten (↓). G= Golgi-Feld.Im Zellkern (N) verstreut kondensierte Chromatinpartikel (⇓).
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 20 000 x)

Einsatz: Lichtmikroskopisches Bild einer fetthaltigen Leberzelle in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.
Semidünnschnitt.Färbung: Methylenblau.(Vergr. 300 x)

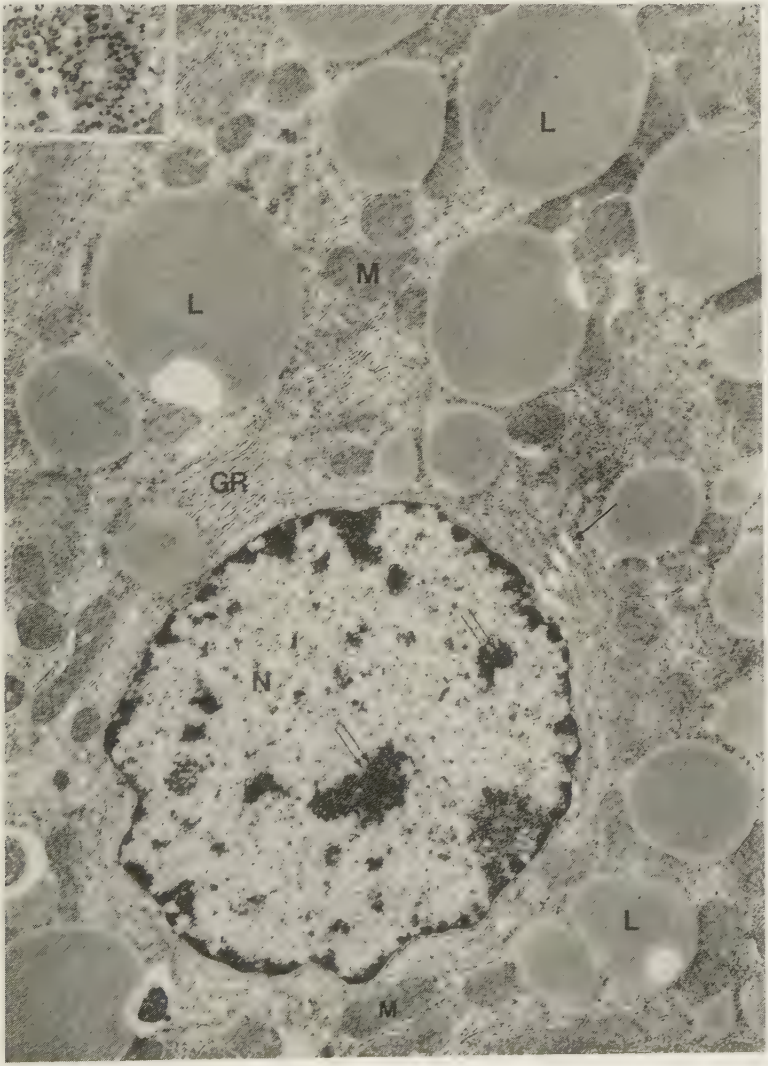

Abb. 28

Zwischen den Hepatocyten,die besonders starke degenerative Veränderungen ihrer Feinstruktur aufweisen,finden sich hie und da elektronenmikroskopische Äquivalentbilder nekrotischer Leberzellen (Abb.29).Auffallend ist,daß in solchen Zellen keine deutliche Trennung von Strukturen, die zum Zellkern gehören und solchen,die Bestandteile des Cytoplasmas darstellen,vorhanden ist.Einige Bezirke dieser nekrotischen Zellen sind ausgefüllt von homogen verteiltem, granulärem Material mittlerer Elektronendichte.Abschnittweise werden diese Bezirke von parallel verlaufenden,osmiophilen Filamenten begrenzt,welche als Reste degenerativ veränderter Membranen angesehen werden können.Außerdem kommen zahlreiche,rundliche Strukturen vor,welche aufgrund ihrer Größe,Elektronendichte und Verteilung an Mitochondrien erinnern und in ihrem Inneren meist mehrere,stark osmiophile,unregelmäßig gestaltete Partikel erkennen lassen.Dazwischen befindet sich feinflockiges Material geringer Elektronendichte,in welchem zahlreiche osmiophile Granula sowie kleine,runde,elektronenoptisch leere Bezirke zu beobachten sind.Eine Zellmembran ist nicht zu erkennen.

Abb.29 Elektronenmikroskopisches Bild einer nekrotischen Leberzelle in einem späten Knoten 74 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.Starke Degeneration sämtlicher Zellbestandteile.
Uranylacetat und Bleizitrat.(Vergr. 15 000 x).

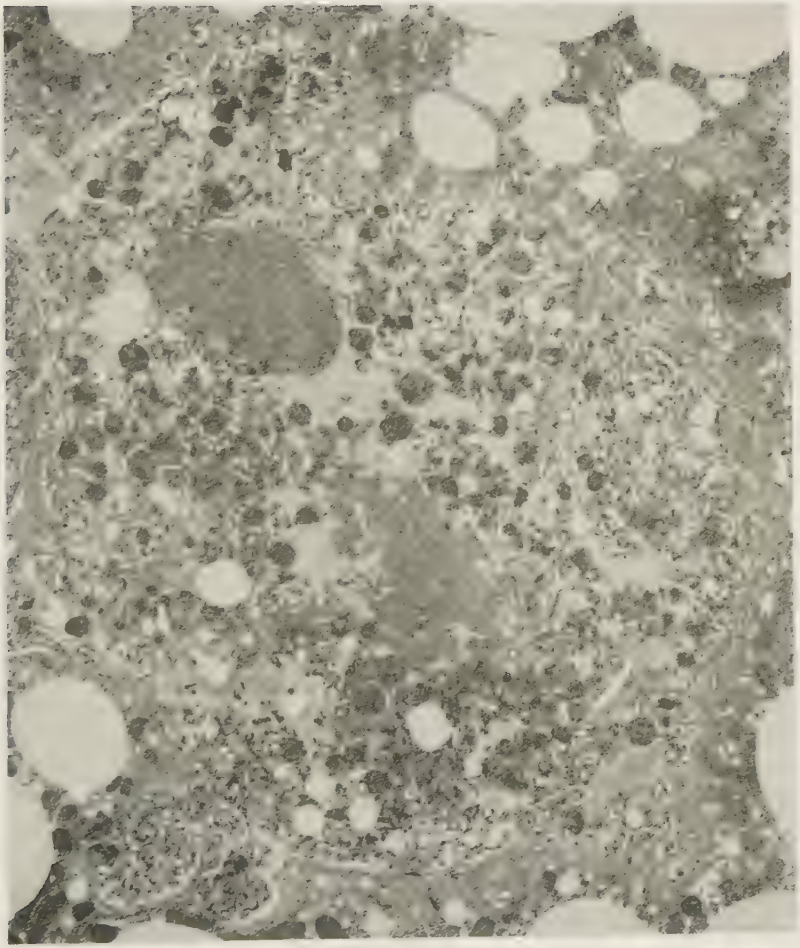

Abb. 29

IV. DISKUSSION

In Übereinstimmung mit den allgemein anerkannten Beurteilungskriterien (BANNASCH,1976) dürfen die Leberveränderungen,die dieser Untersuchung zugrunde liegen,als hyperplastische Knoten bezeichnet werden.Sie erscheinen makroskopisch als umschriebene,runde Parenchymbezirke,welche mehr oder weniger stark über die Leberoberfläche erhaben sind.Lichtmikroskopisch stellen sie örtliche Anhäufungen von Hepatocyten mit auffallend regelloser Zellanordnung dar.

Die vorliegende Untersuchung wurde unter zwei verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt.In Versuch I wurde das achtwöchige Dosierungsschema für Aflatoxin B_1 nach WOGAN (1973) angewendet,von welchem bekannt ist,daß es zu einer Leberkrebsinzidenz von 100 % bei Ratten führt, ohne jedoch toxische Begleiterscheinungen zu verursachen. Bei Versuch II erfolgte die Behandlung der Tiere nach einem intermittierenden Dosierungsschema,das entsprechend den Angaben der Literatur (EPSTEIN et al.,1967) in anderen Modellen der experimentellen Lebercarcinogenese bereits zu einer vermehrten Bildung hyperplastischer Knoten geführt hat.Unsere Ergebnisse haben gezeigt,daß beide Versuchsanordnungen qualitativ gleiche morphologische Veränderungen zur Folge haben.Unterschiede ergeben sich nur dadurch,daß das intermittierende Dosierungsschema zu einer Verkürzung des Zeitintervalls bis zum Erscheinen der ersten hyperplastischen Knoten führt und eine vermehrte Bildung solcher Strukturen verursacht - ein Befund,der die in der Literatur berichteten Beobachtungen (FARBER,1973) bestätigt.Infolge dieser von uns gewählten experimentellen Bedingungen hat sich die vorliegende Untersuchung im Vergleich zu den bereits bekannten Studien anderer Autoren (MERKOW et al.,1967, 1969,1971,BRUNI,1973,BANNASCH et al.,1974) aus zwei Gründen als besonders vorteilhaft erwiesen:

1. Die hyperplastischen Knoten treten erst lange Zeit nach Absetzen des Carcinogens auf (Tab.3) - nicht während der Carcinogengaben,wie in der Literatur bisher berichtet wurde (MERKOW et al.,1967,1969,1971,BRUNI,1973,BANNASCH et al., 1974) - und dürfen daher als unmittelbarer Ausdruck der Lebercarcinogenese angesehen werden.
2. Die unterschiedlichen Erscheinungsformen der hyperplastischen Knoten treten im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Autoren (Tab.1) nicht gleichzeitig auf,sondern sie lassen sich bestimmten,aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogenese zuordnen (Tab.3).Dadurch haben sich besonders günstige Voraussetzungen ergeben,um die makroskopischen und lichtmikroskopischen Beobachtungen durch elektronenmikroskopische Befunde zu ergänzen.

Die Knoten,welche zuerst auftreten (frühe Knoten),sind makroskopisch dadurch charakterisiert,daß sie besonders klein (nie größer als 2 mm) und von hellbraun-rötlicher Farbe sind.Das hervorstechendste lichtmikroskopische Merkmal ist die Heterogenität der Hepatocyten in bezug auf die Zellgröße.Die elektronenmikroskopische Analyse der einzelnen Zelltypen bietet in diesem Zusammenhang eine wichtige Ergänzung.Wie die in Tabelle 4 zusammengefaßten Befunde demonstrieren,sind als elektronenmikroskopische Äquivalente der großen Hepatocyten zwei Haupttypen von Leberzellen abgrenzbar - die Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen) und die Leberzellen mit überwiegend agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen).Dabei ist in letzteren die Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums häufig begleitet von einer Vermehrung des Glykogens.
Vorwiegend jedoch kommen degenerative Aspekte der beiden ultramikroskopischen Zelltypen vor.Bei den Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum kommt es zu einer mehr oder weniger ausgedehnten Auflösung

KENNZEICHNENDE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEOBACHTETEN ERSCHEINUNGSFORMEN HYPERPLASTISCHER KNOTEN IM ZEITLICHEN VERLAUF DER AFLATOXIN B_1- INDUZIERTEN LEBERCARCINOGENESE

Kennzeichen	Frühe Knoten	Mittlere Knoten	Späte Knoten
Erscheinungszeitraum in Wochen:			
Versuch I: nach Versuchsbeginn	59 - 64	93 - 100	109 - 115
nach Absetzen von AFB_1*	51 - 56	85 - 92	101 - 108
Versuch II: nach Versuchsbeginn	45 - 50	72 - 77	83 - 96
nach Absetzen von AFB_1*	33 - 38	60 - 65	71 - 84
Makroskopie:			
Durchmesser in mm	1 - 2	6 - 8	2 - 10
Farbe	hellbraun-rötlich	gelblich-braun	weißlich-grau
Lichtmikroskopie:			
Läppchenarchitektur	weitgehend aufgehoben	weitgehend aufgehoben	weitgehend aufgehoben
Zellgröße	variabel	einheitlich	einheitlich
Kompression des umgebenden Parenchyms	gering	stark	mäßig bis stark

* AFB_1 = Aflatoxin B_1

Tabelle 4

ULTRAMIKROSKOPISCHE MERKMALE DER HEPATOCYTEN IN DEN FRÜHEN KNOTEN
WÄHREND DER AFLATOXIN B_1-INDUZIERTEN LEBERCARCINOGENESE

Zelltypen		Elektronenmikroskopische Merkmale									
		Cytoplasma								Zellkern	
lichtmikroskopisch	elektronenmikroskopisch	Endoplasmatisches Retikulum granulär	Endoplasmatisches Retikulum agranulär	Ribosomen	Glykogen	Mitochondrien	Mikrokörper	Lysosomen	Golgi-Apparat	Elektronendichte des Karyoplasmas	Größe des Nukleo
große Leberzellen	GR*-reiche Leberzellen	↑	0	↑	0	n	n	n	↑	↑	↑↑
	AR**-reiche Leberzellen	↓	↑↑	n	↑	↓	0	0	↓	↑	↑
kleine Leberzellen	GR*-reiche Leberzellen	↑	0	n	↑	↑	n	n	↑	↑	n
	AR**-reiche Leberzellen	↓	↑↑	n	↑	↓	n	n	n	n	↓

*GR = granuläres endoplasmatisches Retikulum;
**AR = agranuläres endoplasmatisches Retikulum;
n = normal; ↑ = vermehrt; ↑↑ = stark vermehrt; ↓ = vermindert; 0 = nicht vorhanden;

der granulären Membranen,während bei den Leberzellen mit überwiegend granulärem endoplasmatischem Retikulum die Umrisse der zerfallenden Strukturen noch länger erhalten bleiben.Auffallend ist,daß die degenerativen Veränderungen hauptsächlich auf die cytoplasmatischen Strukturen beschränkt bleiben.

Die kleinen Hepatocyten,welche gleichfalls einen wesentlichen Bestandteil der frühen Knoten darstellen,sind elektronenmikroskopisch durch dasgleiche Hauptmerkmal charakterisiert wie die großen Hepatocyten - nämlich durch die Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums.Daher konnten sie,wie aus der Darstellung der Befunde in Tabelle 4 hervorgeht,ebenfalls in Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen) und Leberzellen mit überwiegend agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen) unterschieden werden. Wie bei den großen Hepatocyten mit überwiegend granulärem endoplasmatischem Retikulum ist auch bei den kleinen,in ähnlicher Weise veränderten Leberzellen die Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums begleitet von einer Vermehrung des Glykogens.Degenerative Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums sind im Gegensatz zu den großen Leberzellen bei beiden Typen der kleinen Hepatocyten kaum vorhanden.In bezug auf die übrigen cytoplasmatischen Bestandteile wie Mitochondrien,Mikrokörper,Golgi-Felder und Lysosomen entsprechen die kleinen Hepatocyten weitgehend dem typischen Bild der Leberzellen von Kontrolltieren.Neben den beiden Haupttypen der kleinen Leberzellen kommen zahlreiche Übergangsformen vor und sogar Hepatocyten,welche im Vergleich zu denen von Kontrolltieren weitgehend unauffällig erscheinen.

Hyperplastische Knoten,welche zu einem späteren Zeitpunkt der Lebercarcinogenese auftreten (mittlere Knoten) unterscheiden sich von den frühen Knoten vor allem durch ihren größeren Durchmesser (6 bis 8 mm). Lichtmikroskopisch lassen sich die mittleren Knoten von

den frühen Knoten dadurch abgrenzen,daß sie aus einer homogenen Population etwa gleichgroßer Hepatocyten bestehen.Eine deutliche Kompression des angrenzenden Leberparenchyms ist außerdem vorhanden.Wie bei der Zusammenstellung der Befunde in Tabelle 5 zum Ausdruck kommt,sind auch die Hepatocyten in den mittleren Knoten durch eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums charakterisiert.Dennoch gibt es deutliche Unterschiede zu den in ähnlicher Weise veränderten Hepatocyten der frühen Knoten. Beispielsweise unterscheiden sich die Leberzellen mit überwiegend agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen) von den vergleichbaren Leberzellen der frühen Knoten hauptsächlich dadurch,daß das vermehrte agranuläre endoplasmatische Retikulum fast nie mit Glykogen assoziiert ist.Bei den Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen) sind vor allem die degenerativen Veränderungen stärker ausgeprägt als bei den vergleichbaren Leberzellen der frühen Knoten.Im Vordergrund steht dabei eine diffuse Schädigung des granulären endoplasmatischen Retikulums,während es bei den ähnlich modifizierten Hepatocyten der frühen Knoten meistens nur zu einer fokalen Degeneration dieser Strukturen inmitten von Cytoplasmabezirken kommt,in denen das granuläre endoplasmatische Retikulum noch gut erhalten ist.Erstmals treten auch innerhalb der Zellkerne deutliche Veränderungen auf,wenn auch in geringerm Maße als an den cytoplasmatischen Strukturen.Am auffallendsten sind die Nukleoli, welche nicht nur wie manchmal auch in den Hepatocyten der frühen Knoten stark vergrößert sind,sondern sich häufig zusätzlich durch eine fleckförmige Verdichtung ihrer Strukturen auszeichnen.Zuletzt genanntes Merkmal erinnert an die von SVOBODA und HIGGINSON (1968) sowie REDDY und SVOBODA (1968),BUSCH und SMETANA (1970) und SHINOZUKA (1972) beobachtete örtliche Trennung der fibrillären und granulären Komponente innerhalb der Nukleoli von Hepatocyten während der Gabe von Aflatoxin B_1 oder anderen Carcinogenen und

Tabelle 5

ULTRAMIKROSKOPISCHE MERKMALE DER HEPATOCYTEN IN DEN MITTLEREN KNOTEN
WÄHREND DER AFLATOXIN B_1-INDUZIERTEN LEBERCARCINOGENESE

Zelltypen		Elektronenmikroskopische Merkmale									
		Cytoplasma								Zellkern	
lichtmikroskopisch	elektronenmikroskopisch	Endoplasmatisches Retikulum granulär	Endoplasmatisches Retikulum agranulär	Ribosomen	Glykogen	Mitochondrien	Mikrokörper	Lysosomen	Golgi-Apparat	Elektronendichte des Karyoplasmas	Gr d Nukl
große Leberzellen	GR*-reiche Leberzellen	↑↑	0	↑↑	0	↑	0	0	0	n	↑
	AR**-reiche Leberzellen	↓	↑↑	n	0	n	n	n	n	↑	↑

* GR = granuläres endoplasmatisches Retikulum;
** AR = agranuläres endoplasmatisches Retikulum;
n = normal; ↑ = vermehrt; ↑↑ = stark vermehrt; ↓ = vermindert; 0 = nicht vorhanden;

darf daher ebenfalls mit dem allgemein dafür verwendeten Begriff der "Mikrosegregation" bezeichnet werden.

Die letzten Knoten (späte Knoten) vor dem Auftreten typischer Lebercarcinome sind makroskopisch hauptsächlich durch ihre weißlich-graue Farbe charakterisiert.Lichtmikroskopisch sind die meisten Hepatocyten durch eine starke Anfärbbarkeit mit basischen Farbstoffen gekennzeichnet. Nur wenige Leberzellen zeigen eine Fetteinlagerung.Wie die in Tabelle 6 zusammengefaßten Befunde demonstrieren,ist elektronenmikroskopisch das Hauptmerkmal sämtlicher Hepatocyten innerhalb der späten Knoten auf der einen Seite eine mehr oder weniger ausgeprägte Vermehrung des granulären endoplasmatischen Retikulums und auf der anderen Seite der vollständige Mangel an agranulärem endoplasmatischem Retikulum und Glykogen.
Die Leberzellen,die lichtmikroskopisch durch eine kräftige, streifige Basophilie des Cytoplasmas charakterisiert sind, sind in bezug auf die Feinstruktur sowohl des Cytoplasmas als auch des Zellkerns den deutlich degenerierten Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum der mittleren Knoten sehr ähnlich.Sie zeichnen sich ebenfalls durch eine starke Vermehrung und gleichzeitige Degeneration des granulären endoplasmatischen Retikulums aus.
Bei den Leberzellen,die lichtmikroskopisch durch eine mäßige homogene Basophilie des Cytoplasmas gekennzeichnet sind,steht elektronenmikroskopisch eine starke Vermehrung der Mitochondrien im Vordergrund (Mitochondrienreiche Leberzellen).Ähnlich veränderte Zellen wurden vor kurzem von BANNASCH et al. (1980) in basophilen Nierentumoren N-Nitrosomorpholin-vergifteter Ratten entdeckt.Die Autoren sehen Hinweise dafür,daß der Mitochondrienreichtum dieser Zellen auf eine Sauerstoffmangelsituation zurückzuführen sein könnte.Ob diese Deutungsmöglichkeit auch auf die von uns beobachteten mitochondrienreichen Leberzellen der späten Knoten übertragbar ist,bedarf jedoch noch weiterer

Tabelle 6

ULTRAMIKROSKOPISCHE MERKMALE DER HEPATOCYTEN IN DEN SPÄTEN KNOTEN
WÄHREND DER AFLATOXIN B_1-INDUZIERTEN LEBERCARCINOGENESE

Zelltypen		Elektronenmikroskopische Merkmale										
		Cytoplasma									Zellkern	
lichtmikroskopisch	elektronenmikroskopisch	Endoplasmatisches Retikulum granulär	Endoplasmatisches Retikulum agranulär	Ribosomen	Glykogen	Mitochondrien	Mikrokörper	Lysomen	Golgi-Apparat	Fetttropfen	Elektronendichte des Karyoplasmas	Größe des Nukleo
Basophile Leberzellen:												
Leberzellen mit einer kräftigen streifigen Basophilie des Cytoplasmas	GR*-reiche Leberzellen	↑↑	0	↑↑	0	↑	0	0	0	0	↑	↑↑
Leberzellen mit einer mäßigen homogenen Basophilie des Cytoplasmas	Mitochondrienreiche Leberzellen	↑	0	n	0	↑↑	↓	↑	↑	n	n	n
Fetthaltige Leberzellen	Fetthaltige Leberzellen	↑	0	n	0	n	↓	↓	↓	↑↑	n	↓

* GR = granuläres endoplasmatisches Retikulum;
n = normal; ↑ = vermehrt; ↑↑ = stark vermehrt; ↓ = vermindert; 0 = nicht vorhanden;

Untersuchungen.Wichtig erscheint aber im Rahmen der vorliegenden Studie vor allem die Tatsache,daß der hohe Gehalt an Mitochondrien in Zellen zu beobachten ist,in welchen das endoplasmatische Retikulum genau wie in den anderen Zelltypen der späten Knoten ausschließlich in granulärer Form vorliegt.
Das Hauptmerkmal des dritten im histologischen Bild abgrenzbaren Leberzelltyps innerhalb der späten Knoten ist sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch der hohe Gehalt an Fetttropfen (Fetthaltige Leberzellen).Da das Cytoplasma zwischen den Lipidtropfen auch in diesen Zellen zwar granuläres endoplasmatisches Retikulum und freie Ribosomen enthält,agranuläres endoplasmatisches Retikulum und Glykogen jedoch vermissen läßt,liegt die Vermutung nahe,daß sich die Fettspeicherung einer bereits bestehenden Vermehrung des granulären endoplasmatischen Retikulums überlagert hat.

Zusammenfassend wird aus der vorliegenden Untersuchung deutlich,daß die drei nacheinander beobachteten Erscheinungsformen hyperplastischer Knoten der Rattenleber nach Aflatoxin B_1-Gabe (frühe,mittlere und späte Knoten) vorwiegend aus degenerativen Varianten zweier Typen von Hepatocyten bestehen,die durch eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums charakterisiert sind: 1. den Leberzellen mit reichlich granulärem endoplasmatischem Retikulum (GR-reiche Leberzellen) und 2. den Leberzellen mit überwiegend agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den von NOVI (1977, 1979,1981 a,1981 b) berichteten Beobachtungen während der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogenese der Ratte.Unter dengleichen experimentellen Bedingungen,wie sie auch für die vorliegende Studie gewählt wurden,demonstrierte NOVI (1977, 1979,1981 a,1981 b) mit Hilfe kontinuierlicher,korrelierter licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen,daß gleichartige ultramikroskopische Leberzelltypen mit entweder reichlich granulärem (GR-reiche Leberzellen) oder aber überwiegend agranulärem endoplasmatischem Retikulum

(AR-reiche Leberzellen) während des gesamten Verlaufes der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogenese vorkommen.Die beiden Leberzelltypen,die durch eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums gekennzeichnet sind,werden dabei von NOVI (1977,1979) als Entwicklungsstufen eines metabolischen Prozesses angesehen,bei welchem sich die Hepatocyten zum Abbau von Aflatoxin B_1 hin differenzieren.Diese Deutung stützt sich auf seit langem bekannte korrelierte morphologische und biochemische Untersuchungen der Leber während der Gabe toxischer,nicht krebserzeugender Substanzen wie beispielsweise Phenobarbital (REMMER und MERKER,1963, ORRENIUS et al.,1965,CHIESARA et al.,1967,SCHMUCKLER und ARCASOY,1969,CHEDID und NAIR,1972,ALVARES et al.,1973), aus denen hervorgeht,daß die Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums in der Leberzelle als Ausdruck der Anpassung an eine gesteigerte Entgiftungsfunktion der Zellen anzusehen ist.Dabei wird zunächst in den Leberzellen die Voraussetzung für eine vermehrte Proteinsynthese geschaffen - ein Prozeß,der sein morphologisches Korrelat in einer Zunahme des Gehaltes der Zellen an granulärem endoplasmatischem Retikulum findet.Danach erfolgt die Vermehrung derjenigen Enzyme,die für die Entgiftung toxischer Substanzen verantwortlich sind (mischfunktionelle Oxidasen).Diese Enzymbildung wird ultramikroskopisch durch eine Vermehrung des agranulären endoplasmatischen Retikulums widergespiegelt.

Den offensichtlichen Widerspruch,daß die beschriebenen Veränderungen während der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogenese nicht wie unter der Wirkung toxischer nicht krebserzeugender Substanzen (REMMER und MERKER,1963,CHIESARA et al.,1967,SCHMUCKLER und ARCASOY,1969,ALVARES et al.,1973) nur während der Gabe sondern auch noch lange nach Absetzen von Aflatoxin B_1 im Vordergrund der Beobachtungen stehen, führt NOVI (1980) darauf zurück,daß Aflatoxin B_1 noch nach Beendigung der Carcinogengaben in den Leberzellen gespeichert verbleibt.

Wie die vorliegenden Befunde demonstrieren,kommen auch innerhalb der hyperplastischen Knoten nach Aflatoxin B_1-Gabe grundlegend gleichartige ultramikroskopische Zelltypen vor, wie sie unter dengleichen experimentellen Bedingungen während des gesamten Verlaufes der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogenese diffus im Leberparenchym anzutreffen sind (NOVI,1977,1979,1981 a,1981 b).Die heute am weitesten verbreitete Auffassung,daß hyperplastische Knoten eine Population von Hepatocyten mit neuartigen Eigenschaften darstellen und infolgedessen eine besonders entscheidende Zwischenstufe im Hinblick auf die maligne Transformation des Lebergewebes signalisieren (FARBER,1973),läßt sich somit für die Aflatoxin B_1-induzierte Lebercarcinogenese nicht bestätigen.
Hingegen unterstützen die dargelegten Ergebnisse die von NOVI (1977,1979) entwickelte Hypothese der Leberkrebsentstehung unter Wirkung von Aflatoxin B_1,welche darauf beruht, daß Aflatoxin B_1 beziehungsweise seine Metaboliten nach Beendigung der Carcinogenzufuhr in den Leberzellen gespeichert verbleiben und über eine zyklisch erfolgende Freisetzung und Wiedereinspeicherung für den weiteren Verlauf der Carcinogenese verantwortlich sind.
Besonders hinweisend scheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung,daß innerhalb der hyperplastischen Knoten die degenerativen Veränderungen erheblich stärker ausgeprägt sind als in dem diffus veränderten Leberparenchym (NOVI, 1977).Diese Tatsache führt zu der Vermutung,daß die hyperplastischen Knoten Bezirke darstellen,in denen infolge einer veränderten Gewebearchitektur der Leber der Stoffaustausch mit der Umgebung möglicherweise gestört ist,so daß Aflatoxin B_1 dort in relativ höherer Konzentration gespeichert vorkommt als in dem übrigen Leberparenchym.

Abschließend darf festgestellt werden,daß durch die vorliegende Untersuchung nicht nur endgültig belegt werden konnte,daß die sogenannten hyperplastischen Knoten der Leber unmittelbarer Ausdruck der Carcinogenese sind,

sondern darüberhinaus eine günstige Ausgangsbasis dafür geschaffen wurde,die Persistenz von Aflatoxin B_1 auch in den späten Phasen der Lebercarcinogenese mit Hilfe weiterführender biochemischer Untersuchungen zu prüfen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die elektronenmikroskopischen Veränderungen in den Hepatocyten hyperplastischer Knoten während der experimentellen Lebercarcinogenese wurden in Stoppversuchen an Aflatoxin B_1-behandelten Ratten analysiert. Weibliche Wistar II-Ratten erhielten dabei entweder eine Gesamtdosis von 1 mg Aflatoxin B_1 im Laufe von 8 Wochen nach einem kontinuierlichen Dosierungsschema (Versuch I) oder aber die doppelte Dosis Aflatoxin B_1 nach einem diskontinuierlichen Dosierungsschema über 12 Wochen verteilt (Versuch II). Unter beiden experimentellen Bedingungen waren nacheinander - jeweils auf einen bestimmten Zeitraum begrenzt - drei makroskopisch unterscheidbare Erscheinungsformen hyperplastischer Knoten zu beobachten, welche in Abhängigkeit ihres zeitlichen Auftretens in frühe, mittlere und späte Knoten eingeteilt wurden. Das Dosierungsschema für Aflatoxin B_1 beeinflußte dabei nur das Zeitintervall, bis erstmals knotenartige Strukturen zu erkennen waren.

Die frühen Knoten erschienen in Versuch I 51 Wochen und in Versuch II bereits 33 Wochen nach Absetzen des Carcinogens als hellbraun-rötliche, kaum über die Leberoberfläche erhabene Gewebebezirke von 1 bis 2 mm Durchmesser. Lichtmikroskopisch bestanden diese Strukturen aus einer gemischten Zellpopulation großer und kleiner, meist vakuolisierter Hepatocyten. Elektronenmikroskopisch zeigten die meisten dieser Leberzellen eine Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums, welches jedoch häufig gleichzeitig mehr oder weniger starke degenerative Veränderungen aufwies. In einigen Zellen überwog die Vermehrung der granulären Komponente des endoplasmatischen Retikulums (GR-reiche Leberzellen), in anderen dagegen die Zunahme des Anteils an agranulärem endoplasmatischem Retikulum (AR-reiche Leberzellen).

Die mittleren Knoten erschienen in Versuch I 85 Wochen und in Versuch II 60 Wochen nach Absetzen von Aflatoxin B_1.

Makroskopisch waren sie mit einem Durchmesser von 6 bis 8 mm deutlich größer als die frühen Knoten und außerdem im Vergleich zu diesen mehr gelblich gefärbt.Lichtmikroskopisch bestanden sie im Unterschied zu den frühen Knoten aus weitgehend einheitlich erscheinenden Hepatocyten und zeigten am Rande eine deutliche Kompression des angrenzenden Lebergewebes.Die Ultrastruktur der Hepatocyten war dagegen derjenigen in den frühen Knoten sehr ähnlich,wenngleich die degenerativen Veränderungen auch deutlich stärker ausgeprägt waren.
Die späten Knoten erschienen in Versuch I 101 Wochen und in Versuch II 71 Wochen nach Absetzen des Carcinogens.Makroskopisch unterschieden sie sich von den mittleren Knoten vor allem aufgrund ihrer weißlich-grauen Farbe,während sie mit Durchmessern zwischen 2 und 10 mm in bezug auf ihre Größe stark variierten.Lichtmikroskopisch fiel die ausgeprägte cytoplasmatische Basophilie der meisten Hepatocyten sowie die starke Kompression des angrenzenden Leberparenchyms auf.Elektronenmikroskopisch entsprach der lichtmikroskopisch beobachteten Basophilie ein hoher Gehalt an degenerativ verändertem,granulärem endoplasmatischem Retikulum und freien Ribosomen.Das agranuläre endoplasmatische Retikulum fehlte dagegen in sämtlichen Leberzellen der späten Knoten.

Die in der vorliegenden Untersuchung dargelegten Befunde demonstrieren folgendes:

1. Die sogenannten hyperplastischen Knoten sind Ausdruck der carcinogenetischen und nicht der toxischen Wirkung von Aflatoxin B_1;denn die analysierten Strukturen erschienen erst lange nach Absetzen des Carcinogens.
2. Die hyperplastischen Knoten nach Aflatoxin B_1-Gabe bestehen vorwiegend aus degenerativen Varianten von zwei Haupttypen von Hepatocyten mit reichlich endoplasmatischem Retikulum - denen,die durch eine Vermehrung des granulären endoplasmatischen Retikulums charakterisiert sind (GR-reiche Leberzellen) und denen,in welchen das agranuläre endoplas-

matische Retikulum überwiegt (AR-reiche Leberzellen).
Damit konnte demonstriert werden,daß die Hauptveränderungen in den hyperplastischen Knoten nach Aflatoxin B_1-Gabe grundsätzlich von der gleichen Natur sind wie diejenigen,die von NOVI (1977,1979,1981 a,1981 b) unter dengleichen experimentellen Bedingungen während des gesamten Verlaufes der Aflatoxin B_1-induzierten Carcinogenese diffus im Leberparenchym beobachtet und im Sinne einer Differenzierung der Leberzellen zum Abbau von Aflatoxin B_1 gedeutet worden sind (NOVI,1977,1979).
3. Die heute am weitesten verbreitete Hypothese,daß hyperplastische Knoten Populationen von Hepatocyten mit neuartigen Eigenschaften darstellen,und aufgrunddessen eine entscheidende Stufe im Prozeß der malignen Transformation während der Lebercarcinogenese signalisieren,läßt sich aufgrund der vorliegenden Befunde während der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogense nicht bestätigen.
Vielmehr konnte die von NOVI (1977,1979) entwickelte Hypothese der Leberkrebsentstehung unter Wirkung von Aflatoxin B_1 unterstützt werden,welche darauf beruht,daß Aflatoxin B_1 nach Beendigung der Carcinogenzufuhr in den Leberzellen persistiert und über einen zyklischen Mechanismus der Speicherung und Wiederfreisetzung den carcinogenetischen Verlauf bestimmt.
4. Die Tatsache,daß in den Hepatocyten der hyperplastischen Knoten die degenerativen Veränderungen deutlich stärker ausgeprägt sind als dies bekanntermaßen in dem diffus veränderten Leberparenchym zu beobachten ist,führte zu der Vermutung,daß die hyperplastischen Knoten Gewebebezirke darstellen,in denen das persistierende Aflatoxin B_1 möglicherweise in relativ höherer Konzentration vorkommt als in dem übrigen Leberparenchym.

Frau Dr.med.habil.A.M.Novi möchte ich für die Überlassung des Themas und für ihre Hilfe bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit sehr herzlich danken.

Weiter gilt mein Dank Frau L.Hensel für ihre hilfreiche technische Unterstützung.

Zu danken habe ich auch Frau R.Bentele für ihre freundliche Hilfe und Anleitung bei den photographischen Arbeiten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ADAMSON,R.H.,CORREA,P.,SIEBER,S.M.,McINTIRE,K.R., DALGARD,D.W.: Carcinogenicity of Aflatoxin B_1 in rhesus monkeys: two additional cases of primary liver cancer. J.natl.Cancer Inst. 57, 67 - 78 (1976)

(2) ALVARES,A.P.,PRALI,C.J.,MANNERING,G.J.: Induction of drug metabolism - VI. Effects of Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene administration on N-demethylating enzyme systems of rough and smooth hepatic microsomes. Biochem.Pharmacol. 22, 1037 - 1045 (1973)

(3) BANNASCH,P.,HESSE,J.,ANGERER,H.: Hepatocelluläre Glykogenose und die Genese sogenannter hyperplastischer Knoten in der Thioacetamid-vergifteten Rattenleber. Virchows Arch.Abt.B 17, 29 - 50 (1974)

(4) BANNASCH,P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) nodules. Cancer Res. 36, 2555 - 2562 (1976)

(5) BANNASCH,P.,KRECH,R.,ZERBAN,H.: Morphogenese und Mikromorphologie epithelialer Nierentumoren bei Nitrosomorpholin-vergifteten Ratten - IV. Tubuläre Läsionen und basophile Tumoren. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 98, 243 - 265 (1980)

(6) BRUNI,C.: Distinctive cells similar to fetal hepatocytes associated with liver carcinogenesis by Diethylnitrosamine.Electron microscopic study. J.natl.Cancer Inst. 50, 1513 - 1528 (1973)

(7) BUSCH,H.,SMETANA,K.: Effects of drugs and other agents on the nucleolus.In: The Nucleolus. Academic Press,New York - London,1970, 472 - 610

(8) CHEDID,A.,NAIR,V.: Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: electron microscopic study.
Science, 175, 176 - 179 (1972)

(9) CARNAGHAN,R.B.A.: Hepatic tumors in ducks fed a low level of groundnut meal.
Nature (Lond.) 208, 308 (1965)

(10) CHIESARA,E.,CLEMENTI,F.,CONTI,F.,MELODESI,J.: The induction of drug-metabolizing enzymes in rat liver during growth and regeneration.A biochemical and ultrastructural study.
Lab.Invest. 16, 254 - 267 (1967)

(11) EMMELOT,P.,SCHERER,E.: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis.A quantitative approach.
Biochimica et Biophysica Acta (CR) 605, 247 - 304 (1980)

(12) EPSTEIN,S.,ITO,N.,MERKOW,L.,FARBER,E.: Cellular analysis of liver carcinogenesis.I. The induction of large hyperplastic nodules in the liver with 2-Fluorenylacetamide or Ethionine and some aspects of their morphology and glycogen metabolism.
Cancer Res. 27, 1702 - 1711 (1967)

(13) FAHIMI,H.D.: Perfusion and immersion fixation of rat liver with glutaraldehyde.
Lab.Invest. 16, 736 - 750 (1967)

(14) FARBER,E.: Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of rat by Ethionine,2-Acetylaminofluorene and 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 15, 142 - 155 (1955)

(15) FARBER,E.: Hyperplastic liver nodules.In: Methods in Cancer Research Vol. VII,Hrsg.: H.Busch, Academic Press Inc. - New York, 1973, 345 - 375

(16) FARBER,E.,SAMA,D.S.R.,RAJALAKSHMI,S.,SHINOZUKA,H.: Liver carcinogenesis: A unifying hypothesis.In: The Liver/Normal and Abnormal Functions Part B, Hrsg.: F.F.Becker; Marcel Dekker,Inc. New York, 1975, , 755 - 771

(17) FARBER,E.: On the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma.In: Hepatocellular Carcinoma.Kunio Okuda,Hrsg.: Robert L.Peters, John Wiley and Sons - New York, 1976 a, 3 - 22

(18) FARBER,E.: The pathology of experimental liver cell cancer.In: Liver Cell Cancer.Hrsg.: H.M.Cameron, D.A.Linsell,G.P.Warwick.Elsevier 1976 b, 243 - 277

(19) FARBER,E.,HARTMANN,S.P.,SOLT,D.,CAMERON,R.: Precancerous liver cell populations and their identification.In: Foundamentals in Cancer Prevention,Hrsg.: P.N.Magee et al.,Univ.of Tokyo/Univ.Park Press,Baltimore, 1976, 71 - 87

(20) GANOTE,C.E.,MOSES,H.L.: Light and dark cells as artefacts of liver fixation. Lab.Invest. 18, 740 - 745 (1968)

(21) HALVER,J.E.: Aflatoxicosis and trout hepatoma.In: Aflatoxin: Scientific Background,Control,and Implications,Hrsg.: L.A.Goldblatt,Academic Press,New York - London, 1969, 265 - 306

(22) KALENGAY,M.M.R.,DESMET,V.J.: Sequential histological and histochemical study of the rat liver during Aflatoxin B_1-induced carcinogenesis. Cancer Res. 35, 2845 - 2852 (1975)

(23) LANCASTER,M.C.,JENKINS,F.P.,PHILIP,J.M.: Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature (Lond.), 192, 1095 - 1097 (1961)

(24) MAUGH II,T.H.: Chemical carcinogenesis: How dangerous are low doses ? Science 202, 37 - 41 (1978)

(25) MERKOW,L.P.,EPSTEIN,S.M.,CAITO,B.J.,BARTUS,B.: The cellular analysis of liver carcinogenesis - II. Ultrastructural alterations within hyperplastic nodules induced by 2-Fluorenyl-acetamide. Cancer Res. 27, 1712 - 1721 (1967)

(26) MERKOW,L.P.,EPSTEIN,S.M.,FARBER,E.,PRADO,M.,BARTUS,B.: Cellular analysis of liver carcinogenesis - III. Comparison of the ultrastructure of hyperplastic liver nodules and hepatocellular carcinomas induced in rat liver by 2-Fluorenyl-acetamide. J.natl.Cancer Inst. 43, 33 - 42 (1969)

(27) MERKOW,L.P.,EPSTEIN,S.M.,SLIFKIN,M.,FARBER,E.,PRADO,M.: Ultrastructural alterations within hyperplastic liver nodules induced by Ethionine. Cancer Res. 31, 174 - 178 (1971)

(28) NEWBERNE,P.M.,WOGAN,G.N.: Sequential morphologic changes in Aflatoxin B_1 carcinogenesis in rat. Cancer Res. 28, 770 - 781 (1968)

(29) NEWBERNE,P.M.,BUTLER,W.H.: Acute and chronic effects of Aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. Cancer Res. 29, 236 - 250 (1969)

(30) NEWBERNE,P.M.: Experimental hepatocellular carcinogenesis. Cancer Res. 36, 2573 - 2578 (1976)

(31) NOVI,A.M.: Liver carcinogenesis in rats after Aflatoxin B_1 administration.A light- and electron-microscopic study. Curr.Top.Path. 65, 115 - 163 (1977)

(32) NOVI,A.M.: Molekuläre und zelluläre Vorgänge während der Frühphase der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogense. Verh.Dtsch.Ges.Path. 63, 476 - 478 (1979)

(33) NOVI,A.M.: Covalent interaction of ^{14}C-Aflatoxin B_1 with macromolecules of rat liver during Aflatoxin B_1-carcinogenesis. Toxicology Letters Supp. 1, 70 (1980)

(34) NOVI,A.M.: Phenotypic identity of preneoplastic and neoplastic hepatocytes during Aflatoxin B_1 (AFB_1)-induced liver carcinogenesis. J.Cancer Res.Clin.Oncol. 99, A39 (1981 a)

(35) NOVI,A.M.: Korrelierte licht- und elektronenmikroskopische Analyse der sogenannten hyperbasophilen Zellen während der Aflatoxin B_1-induzierten Lebercarcinogense.
Verh.Dtsch.Ges.Path. 65 (1981 b)

(36) ORRENIUS,S.,ERICSSON,J.L.E.,ERNSTER,L.: Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study.
J.Cell Biol. 25, 627 - 639 (1965)

(37) PEERS,F.G.,GILMANN,G.A.LINSELL,C.A.: Dietary Aflatoxins and human liver cancer.A study in Swaziland.
Internat.J.Cancer 17, 167 - 176 (1976)

(38) PITOT,H.C.: The stability of events in the natural history of neoplasia.
Amer.J.Path. 89, 703 - 716 (1977)

(39) POPPER,H.,STERNBERG,S.S.,OSER,B.L.,OSER,M.: The carcinogenic effect of Aramite in rats.A study of hyperplastic nodules.
Cancer 13, 1035 - 1046 (1960)

(40) REDDY,J.,SVOBODA,D.: The relationship of nucleolar segregation to ribonucleic acid synthesis following administration of selected hepatocarcinogens.
Lab.Invest. 19, 132 - 145 (1968)

(41) REDDY,J.K.,SVOBODA,D.J.,RAO,M.S.: Induction of liver tumors by Aflatoxin B_1 in the tree shrew (Tupaia glis),a nonhuman primate.
Cancer Res. 36, 151 - 160 (1976)

(42) REMMER,H.,MERKER,H.-J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal).
Klin.Wschr. 41, 276 - 283 (1963)

(43) van RENSBURG,S.J.,KIRSIPUU,A.,COUTINHO,L.P.,van der WATT,J.J.: Circumstances associated with the Contamination of food by Aflatoxin in high primary liver cancer area.
S.Afr.med.J. 49, 877 - 883 (1975)

(44) REUBER,M.D.: Development of preneoplastic and neoplastic lesions of the liver in male rats given 0,025 percent N 2-Fluorenyldiacetamide.
J.natl.Cancer Inst. 34, 697 - 721 (1965)

(45) RUEBNER,B.H.,MICHAS,C.,KANAYAMA,R.,BANNASCH,P.: Sequential hepatic histologic and histochemical changes produced by Diethylnitrosamine in rhesus monkey.
J.natl.Cancer Inst. 57, 1261 - 1267 (1976)

(46) SATO,S.,MATSUSHIMA,T.,TANAKA,N.,SUGIMURA,T., TAKASHIMA,F.: Hepatic tumors in the guppy (Lebister reticulatus) induced by Aflatoxin B_1, Dimethylnitrosamine,and 2-Acetylaminofluorene.
J.natl.Cancer Inst. 50, 765 - 778 (1973)

(47) SCHMUCKLER,E.A.,ARCASOY,M.: Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymal cells.
Internat.Rev.exp.Path. 7, 305 - 419 (1969)

(48) SHINOZUKA,H.: Response of nucleus and nucleolus to inhibition of RNA synthesis.In: The Biochemistry of Disease Vol.II,Hrsg.: Marcel Dekker Inc. New York, 1972, 73 - 103

(49) SHANK,R.C.,BHAMARAPRAVATI,N.,GORDEN,J.E.,WOGAN,G.N.: Dietary Aflatoxins and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand. Food Cosmet.Toxicol. 10, 171 - 179 (1972)

(50) SOLT,D.B.,MEDLINE,A.,FARBER,E.: Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. Amer.J.Path. 88, 595 - 618 (1977)

(51) SVOBODA,D.,HIGGINSON,J.: A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogens. Cancer Res. 28, 1703 - 1733 (1968)

(52) TEEBOR,G.W.,SEIDMANN,J.: Retention of metabolic regulation in the hyperplastic nodule induced by N-2-Fluorenylacetamide. Cancer Res. 30, 1095 - 1101 (1970)

(53) TEEBOR,G.W.,BECKER,F.F.: Regression and persistence of hyperplastic hepatic nodules induced by N-2-Fluorenylacetamide and their relationship to hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 31, 1 - 3 (1971)

(54) WARD,J.M.,SONTAG,J.M.,WEISBURGER,E.K.,BROWN,C.A.: Effect of lifetime exposure to Aflatoxin B_1 in rats. J.natl.Cancer Inst. 55, 107 - 113 (1975)

(55) WOGAN,G.N.: Chemical nature and biological effects of Aflatoxins.
Bacetriol.Rev. 30, 460 - 470 (1966)

(56) WOGAN,G.N.: Aflatoxin Carcinogenesis.In: Methods in Cancer Research Vol.II,Hrsg.: H.Busch, Academic Press,New York - London, 1973, 309 - 344

LEBENSLAUF

Am 10. Februar 1955 wurde ich als Tochter des Diplom-Ingenieurs Heinz-Günter Schmolke und seiner Ehefrau Ortrun Schmolke geb.Ringel in Bremerhaven geboren.

In Düsseldorf besuchte ich die Volksschule und das städtische Luisengymnasium,wo ich 1973 das Abitur bestand.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1974 in Düsseldorf,wo ich auch die Ärztliche Vorprüfung ablegte und am 1. Juli 1980 nach Bestehen der Ärztlichen Prüfung die Approbation erhielt.

Nachdem ich anschließend noch ein halbes Jahr am Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf als wissenschaftliche Hilfskraft tätig war,bin ich seit 1. Januar 1981 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.